Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG EINES BENZODIAZEPINDERIVATES FLUNITRAZEPAM AUF DIE FREISETZUNG VON FOLLIKELSTIMULIERENDEM UND LUTEINISIERENDEM HORMON AUS DER HYPOPHYSE

INAUGURAL–DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Anna Josefa Stock geb. Nafz
aus Osterburken

1978

Aus der Frauenklinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. A. Hirsch

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE WIRKUNG EINES BENZODIAZEPINDERIVATES FLUNITRAZEPAM AUF DIE FREISETZUNG VON FOLLIKELSTIMULIERENDEM UND LUTEINISIERENDEM HORMON AUS DER HYPOPHYSE

INAUGURAL–DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard–Karls–Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Anna Josefa Stock geb. Nafz
aus Osterburken

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. H.–E. Hoffmeister
1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Heller
(Professor Dr. H. A. Hirsch)
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. K. Hayduk

Geschrieben und gedruckt bei H.–J. Köhler, 7400 Tübingen, Neue Straße 11

Meinen Eltern gewidmet

Herrn Professor Dr. S. Heller danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes.

Herr Kurt Eberle, Herr Walter Eberle, Herr Lorenz, Frl. Öhme, Frl. Schoch und Frl. Straub unterstützten mich bei der Durchführung der Untersuchungen.

Ich danke ihnen dafür recht herzlich.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	EINLEITUNG	1
I	Die Steuerung der weiblichen Keimdrüsenfunktion	1
II	Die Wirkung des Hypothalamus und übergeordneter Zentren auf den Hypophysenvorderlappen	2
	1. Anatomischer Gegenstand der zentralen Steuerung	2
	2. Darstellung der Regulationsvorgänge zwischen Hypophyse und Hypothalamus	6
	3. Rezeptoren	10
III	Der weibliche Zyklus als Regelkreissystem	13
IV	Ausgangspunkt für den experimentellen Teil der Arbeit	14
V	Flunitrazepam als Faktor für den Gonadotropin-Release	18
B	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	20
C	MATERIAL UND METHODIK	21
D	ERGEBNISSE	42
E	DISKUSSION	81
F	ZUSAMMENFASSUNG	87
G	LITERATURVERZEICHNIS	88
	LEBENSLAUF	

ABKÜRZUNGEN

B_o	:	Bindung ohne Antigen
B_x	:	Bindung mit Antigen
BSA	:	Bovine Serum Albumin = Rinderserum-albumin
FSH	:	Follikel stimulierendes Hormon
FSH-RH	:	FSH Releasing Hormon = FSH - Releasing Factor
GABA	:	Gammaaminobuttersäure
HCG	:	Human Chorion Gonadotropin
HVL	:	Hypophysenvorderlappen
LD 50	:	Dosis, bei welcher 50 % der Individuen eines Kollektivs getötet werden.
LH	:	Luteinisierendes Hormon
LH-RH	:	LH Releasing Hormon = LH Releasing Factor
LTH	:	Luteotropes Hormon = Prolaktin
p.i.	:	post injectionem
mg OG/100 g TG	:	Verhältnis Ovargewicht zu Tiergewicht = biologische FSH-Aktivität
OAAD	:	Ovarascorbinsäureverarmung = biologische LH-Aktivität
PBS	:	Phosphate Buffer Solution = Phosphatpufferlösung
RF	:	Releasing Factor = Releasing Hormon

A EINLEITUNG

I Die Steuerung der weiblichen Keimdrüsenfunktion

Die weiblichen Keimdrüsen schütten in regelmäßigen Zyklen Hormone aus, welche die Genitalorgane wie Eileiter, Uterus, Vagina, Vulva und Mammae stimulieren. In der Follikelphase werden hauptsächlich Östrogene, in der Lutealphase vorwiegend Progesteron gebildet.

Die Prägung der Follikel-, bzw. der Lutealphase erfolgt durch die Wirkung der sogenannten Gonadotropine FSH, LH und LTH aus dem Hypophysenvorderlappen. Die Bedeutung des dritten Gonadotropins, LTH, für die einzelnen Zyklusphasen ist noch nicht genau bekannt.

Unter der Wirkung des Follikel stimulierenden Hormons entwickelt sich ein Follikel bis zum Tertiärstadium. FSH allein hat keine inkretorische Wirkung. FSH und luteinisierendes Hormon gemeinsam fördern sowohl das Follikelwachstum bis zur Sprungreife als auch die Ovulation. Zusammen mit LTH fördert FSH die Bildung des Corpus luteum. Die Steroidbiosynthese im Gelbkörper wird durch LH allein stimuliert.

Follikelreifung, Eisprung, Gelbkörperbildung und Steroidbiosynthese sind das Ergebnis einer zeitlich und mengenmäßig genau festgelegten Beziehung der beiden Gonadotropine FSH und LH untereinander. Die Steuerung dieser Hormonspiegel geschieht einerseits durch die Inkretion von sogenannten Releasing-Faktoren aus dem Hypothalamus, andererseits durch die sogenannte Rückkopplungswirkung der Steroide aus den Ovarien.

II Die Wirkung des Hypothalamus und übergeordneter Zentren auf den Hypophysenvorderlappen

1. Anatomischer Gegenstand der zentralen Steuerung

Obwohl zwischen Hypothalamus und Hypophysenvorderlappen keine Nervenverbindungen bestehen, kann man durch Zerstörung oder Stimulation bestimmter Zwischenhirnarenale bzw. Zentren der Temporalregion die FSH- und LH-Inkretion der Hypophyse stimulieren oder hemmen.

MARTINI et al. (1969) stellten nach Zerstörung der Nuclei arcuati und ventromediales der Area suprachiasmatica einen Ausfall der hypophysären LH-Ausschüttung fest. Die FSH-Ausschüttung dagegen wurde durch Zerstörung der Area paraventricularis unterbunden.

FRASCHINI et al. (1968) machten die Beobachtung, daß bei Läsionen der Nuclei ventromediales der Area suprachiasmatica wie auch der Nuclei arcuati die Konzentration des LRF an der Eminentia mediana abnahm, während bei Läsionen der Nuclei paraventriculares die Konzentration des FRF an dieser Stelle absank.

SCHNEIDER und McCANN inkubierten 1970 ein Präparat aus Eminentia mediana, Hypophysenstiel und Adenohypophyse in einem Nährmedium aus Dopamin, Serotonin, Adrenalin und Noradrenalin. Ihre Versuche zeigten, daß nur bei Dopamin ein FSH- und LH-Release stattfindet, was zu der Schlußfolgerung führte, daß die Fortsätze zur Eminentia mediana dopaminerg sind. Da Dopamin allein keinen Release zu erzeugen vermag, wenn in dem Präparat Hypothalamus und Hypophysenstiel fehlen, nimmt man an, daß der RF an der Eminentia mediana durch dopaminerge Neuren freigesetzt wird. Der Releasing-Faktor und Dopamin befinden sich beide im gleichen Neuron. Die Freisetzung des Dopamins aus seinen Granula hat eine Freisetzung des Releasingfaktors zur Folge.

Bei der Zerstörung der Nuclei arcuati und ventromediales, bzw. der Nuclei paraventriculares, blieb die von HARRIS et al. (1952) geforderte Integrität des Pfortadersystems gewahrt. Schon vorher hatten WESTMANN und JACOBSOHN (1938) den Hypophysenstiel durchtrennt, worauf es zur Atrophie der Ovarien gekommen war. GREEN und HARRIS stellten 1947 mittels Tinteinjektion fest, daß das Blut in dem von POPA und FIELDING (1931) zum erstenmal beschriebenen Portalgefäßsystem von der Eminentia mediana zum Hypophysenvorderlappen fließt.

Wie Stimulationsversuche erwiesen, muß man bei der LH-Inkretion zwischen zyklischer und basaler LH-Abgabe unterscheiden. BARRACLOUGH und GORSKI (1961), DESCLIN et al. (1962) und FLERKO und BARDOS (1961) gaben an, daß die zyklische Abgabe von LH in der präoptisch suprachiasmatischen Region, die basale LH-Inkretion im Gebiet des Nucleus arcuatus und in den ventralen Anteilen des Nucleus ventromedialis stattfindet. Die basale LH-Inkretion regt zwar die Östrogenbiosynthese an, sie kann jedoch keine Ovulation auslösen. HIROI et al. (1965) bzw. EVERETT und QUINN (1966) fanden weitere Hinweise auf den Dualismus der zyklischen und basalen LH-Inkretion. HIROI et al. beobachteten nach Stimulation des Nucleus ventromedialis beim Kaninchen einen Anstieg der Östrogen- und Pregnandiolausscheidung. EVERETT und QUINN stellten nach Aktivierung präoptischer Kerngebiete bei der Ratte eine Ovulation fest. Eine Ovulation erfolgte jedoch nur, wenn die entsprechende Kernregion über einen bestimmten Zeitraum stimuliert wurde (EVERETT 1965).

Im extrathalamischen Bereich fand man Hirnareale, welche die Sexualität hemmen. Juvenile Ratten entwickeln nach Elektrokoagulation der Nuclei amygdalei und des vorderen Hypothalamus eine Pubertas praecox (ELWERS und CRITCHLOW, 1960). ELEFTHERIOU et al. (1970) konnten nachweisen, daß der LH-Gehalt im Plasma und in der Hypophyse der männlichen Weißfußmaus (peromyscus maniculatus) nach gezielter Zerstörung des basolateralen und kortikalen, nicht

aber des medialen Gebietes, ansteigt. Auch im Hypothalamus war nach Zerstörung der basolateralen und kortikalen Teile des Nucleus amygdaleus ein Anstieg des LRF-Gehaltes festzustellen, während er in der Eminentia mediana abfiel. Nach Koagulation des medialen Anteils des Nucleus amygdaleus nahm der LRF-Gehalt des Hypothalamus ab.

SZENTAGOTHAI et al. (1968) wiesen histologisch und histochemisch nach, daß von der Formatio reticularis und vom limbischen System afferente Fasern zum Hypothalamus laufen. Nach AKERT (1964) sind das limbische System und die Formatio reticularis an der Regulation und Übertragung der Impulse von der Cortex zu den Zentren des Hypothalamus beteiligt.

VELASCO und TALEISNIK (1971) untersuchten die Beziehung zwischen dem limbischen System und dem Hypothalamus, speziell zwischen dem Nucleus amygdaleus und Hippocampus einerseits und der präoptischen Region des Hypothalamus andererseits. Der mediale kortikohypothalamische Trakt, der vom Hippocampus kommt (NAUTA 1956, RAISMAN, COWAN und POWELL, 1966), und die Stria terminalis, welche vom Nucleus amygdaleus ausgeht (HEINER und NAUTA, 1969), laufen beide durch die präoptische Region zum Infundibulum. Diese limbischen Efferenzen können vor dem Erreichen der präoptischen Region unterbrochen werden. Die akute Unterbrechung der Stria terminalis oder die Zerstörung des Amygdaloids zur Zeit des Proöstrus führte nicht zu der erwarteten Ovulation, weshalb man einen fördernden Einfluß dieser Strukturen auf die Ovulation vermutet. Die Unterbrechung des kortikohypothalamischen Traktes jedoch änderte nichts an der spontanen ovulatorischen Antwort. VELASCO und TALEISNIK (1971) unterstützen mit ihren Ergebnissen die Vorstellung, daß bestimmte neurale Elemente der mittleren präoptischen Region imstande sind, Stimuli auszusenden, welche dann eine ovulatorische Gonadotropinfreisetzung auslösen.

RAISMAN et al. beschrieben 1966 die zwei wichtigsten vom Hippocampus wegführenden Bahnen, die Fimbrien und die dorsale Fornix. Eine Zerstörung des kortikohypothalamischen Traktes fand sich nur nach Zerstörung der Fimbrien, nicht jedoch nach Unterbrechung der dorsalen Fornix.

Die Unterbrechung der amygdaloid-hippocampalen Efferenzen hatte keinen Einfluß auf den LH-Plasmaspiegel nach Ovariektomie, sodaß man annehmen kann, daß die limbischen Strukturen die tonische LH-Ausschüttung nicht beeinflussen. Diese Ergebnisse fügen sich gut in die Vorstellung, daß der Auslöser für den ovulatorischen Mechanismus der Gonadotropinausschüttung in der präoptischen Region liegt. Das Corpus amygdaleum und der Hippocampus bringen Einflüsse von gegensätzlicher Natur zur Geltung und sind Teile eines modulierenden Systems, welches die Funktion des primär stimulierenden präoptisch-hypothalamischen Gebietes steuert. Nach Ausschaltung der modulierenden limbischen Einflüsse bleibt die Funktion der präoptischen Region bestehen. Diese Tatsache stimmt mit der Vorstellung von GLOOR (1956) überein, daß das limbische System nicht grundsätzlich die Funktionen integriert, zu deren Beeinflußung es fähig ist, sondern eher als Modulator funktioneller Muster wirkt, welche auf der Höhe des Hypothalamus und des Tegmentum bestehen.

Es gibt Hinweise dafür, daß die Epiphyse einen spezifischen Effekt auf die Fuunktion des Hypophysenvorderlappens ausübt. WURTMANN et al. (1961) fanden bei weiblichen Ratten nach Entfernung der Epiphyse eine Ovargewichtszunahme. BINDONI und RAFFAELE (1968) stellten nach Epiphysenexstirpation eine erhöhte Mitoserate in der Hypophyse fest. PAVEL und PETRESCU (1966) konnten sowohl durch synthetisches Arginin-Vasotocin als auch durch Pinealarginin-vasotocin die Wirkung des Stutenserumgonadotropins auf den Uterus der Maus hemmen. SOFFER et al. (1965) hemmten mit Rinderpinealextrakt die Wirkung von menschlichem Menopausen- und Choriongonadotropin. Nach Implantation von Pinealgewebe oder Melatonin in die Eminentia mediana war sowohl der LH-Gehalt der Hypophyse als auch der des

Serums erniedrigt. Die Implantation in die Hypophyse zeigte keine Wirkung.

Nach elektrischer Stimulation der Eminentia mediana bei ovariektomierten, östrogenbehandelten Schafen stellte MALVEN (1975) einen signifikanten Anstieg der Plasma-LH-Spiegel fest. Bei unbehandelten Kastraten fanden in ungefähr einstündigen Abständen spontane LH-Entleerungen (LH-Rhythmus) statt. Stimulationen der Eminentia mediana, welche fünf bis fünfzehn Minuten nach einer spontanen Entleerung stattfanden, führten zu einem erhöhten LH-Spiegel, ähnlich wie Stimulationen der Eminentia mediana zu anderen Zeitpunkten oder wie spontane Entleerungen. Diese Tatsachen deuten keineswegs auf eine hypophysäre Refraktärität gegenüber der Eminentia-mediana-Stimulation oder gegenüber dem endogenen Releasing-Faktor. Deshalb wurde vermutet, daß der rhythmische LRF-Release über neurale Mechanismen zustande kommt.

Durch Chlorpromazin wurde die LH-Ausschüttung nicht in erkennbarer Weise beeinträchtigt, was zu der Annahme führt, daß für die Anregung einer LH-Ausschüttung eine synaptische Übertragung, die durch Chlorpromazin blockiert wird, nicht erforderlich ist. MALVEN (1975) nahm daher an, daß die LRF produzierenden Neurone direkt aktiviert wurden.

2. Darstellung der Regulationsvorgänge zwischen Hypophyse und Hypothalamus

NIKITOWITCH-WINER und EVERETT (1958) pflanzten Rattenhypophysen in die vordere Augenkammer und unter die Nierenkapsel. Daraufhin lief kein Sexualzyklus mehr ab und die LTH-Ausschüttung stieg an. Nach anschließender Reimplantation der Hypophyse in die Sella turcica kam wieder ein regelmäßiger Sexualzyklus in Gang. Die Zeitspanne zwischen Reimplantation und erneutem Auftreten des Zyklus war jedoch zu kurz, als daß in ihr eine Regeneration von Nervenfasern hätte stattfinden können. Da die Nerven- und Gefäßversorgung der Hypophyse

vollständig unterbrochen war, wurde ein neurohumoraler Übertragungsmechanismus vermutet. WATSON, KRULICH und McCANN (1971) untersuchten an normalen und an orchidektomierten Ratten die Wirkung von ungereinigtem Rattenhypothalamusextrakt auf die Serumgonadotropinspiegel. Sowohl bei normalen als auch bei frisch und bei schon länger kastrierten Ratten, denen Hypothalamusextrakte gespritzt wurden, fand sich ein signifikant erhöhter Serum-LH-Spiegel, während Hirnrindenextrakte die Serum-LH-Spiegel nicht beeinflußten.

WAKABAYASHI, ANTUNES-RODRIGUES, TAMAOKI und McCANN (1972) inkubierten Rattenadenohypophysen alternativ mit einem Schafshypothalamusextrakt (HE) und dessen Ultrafiltrat (HEUF). HEUF bewirkte einen dosisabhängigen LH-Release, veränderte jedoch nicht den Gesamt-LH-Gehalt des Systems.

Die hypophysäre Synthese und Ausschüttung von Gonadotropinen wird durch sogenannte Releasing- und Inhibiting-Faktoren gesteuert. Wie für die anderen hypophysären Hormone fordert man auch für die Gonadotropine (FSH, LH, LTH) drei hypothalamische Faktoren: FRF, LRF, PIF.

Im Gegensatz zu den Releasingfaktoren von FSH und LH (FRH und LRH) ist für LTH (=Prolaktin) ein Inhibiting-Faktor (PIF) zuständig.

Wie die Versuche von NIKITOWITCH und WINER (1958) zeigten, kommt es nach Verpflanzung der Hypophyse unter die Nierenkapsel zu einer vermehrten LTH-Produktion. Auch FLAMEND-DURANT (1964) und FLERKO und BARDOSZ (1961) fanden nach Elektrokoagulation des Gebietes dorsolateral vom Nucleus paraventricularis eine vermehrte LTH-Ausschüttung.

Der Hypothalamus kontrolliert den Gonadotropinrelease durch Peptide. Hypothalamische Extrakte üben sowohl eine FSH- als auch eine LH-Releasing-Aktivität aus (McCANN, 1962; IGARASHI, NALLAR und McCANN, 1964). DHARIWAL, ANTUNES-RODRIGUES und McCANN (1965) reinigten die LH-Releasing-Aktivität und trennten sie von ande-

ren hypothalamischen Faktoren. Die beiden hitzestabilen FRF und LRF konnten bisher nicht getrennt werden (RAMIREZ et al. 1964, SCHALLY et al. 1966, FAWCETT et al. 1968).

WHITE (1970) nahm an, daß FSH und LH durch ein gemeinsames Peptid freigesetzt werden. SCHALLY konnte 1971 ein synthetisches Dekapeptid herstellen, welches die gleichen biologischen Eigenschaften besitzt wie eine Substanz, die man aus Schweinehypothalami extrahiert hatte.

SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., KASTIN, A.j., MATSUO, H., BABA, Y., REDDING, T.W., NAIR, R.M.G. and DEBELJUK, L. (1971a); SCHALLY, A.V., BABA, Y., REDDING, T.W., MATSUO, H. and ARIMURA, A. (1971); SCHALLY, A.V., NAIR, R.M.G., REDDING, T.W. and ARIMURA, A. (1971b).
Es handelt sich dabei um ein Dekapeptid mit der Sequenz:

PYROGLU-HIS-TRY-SER-TYR-GLY-LEU-ARG-PRO-GLY-NH_2

Wenn dieses synthetische Dekapeptid (z.B. 25 µg) einer gesunden Frau gespritzt wird, so erfolgt nach fünf bis zehn Minuten ein steiler Anstieg des Serum-LH und ein gegenüber dem Serum-LH verzögerter Anstieg des Serum-FSH.

Da die FSH- und die LH-Ausschüttung getrennt hervorgerufen werden können, was an Stimulierungs- und Zerstörungsversuchen gezeigt wurde, postulieren McCANN, OJEDA, FAWCETT und KRULICH (1974) im Gegensatz zu WHITE et al. (1970) zwei verschiedene hypothalamische Releasing-Faktoren.

HELLER (1972) und HELLER und SCHLUMBERGER (1971) stellten fest, daß dieses synthetische Dekapeptid Unterschiede zum menschlichen LH-FSH-RF aufweist.

Nach Verabreichung eines Schafshypothalamusextraktes (OHE), eines synthetischen gonadotropen Releasing-Faktors und von Dibutyryl-c-AMP konnten GROOM und BOYNS (1973) eine Freisetzung von LH und

FSH in menschlichen Adenohypophysenkulturen beobachten. Dabei war die LH-Ausschüttung stärker als die FSH-Ausschüttung. Der synthetische Releasing-Faktor führte zu einem Anstieg des gesamten FSH- und LH-Gehaltes in den Kulturen.

Die Behandlung von Ratten-Hypophysen in vitro mit dem synthetischen Releasing-Faktor stimuliert LH und FSH gleichermaßen (SCHALLY, REDDING, MATSUO und ARIMURA, 1972).

Da kein Unterschied in den Wirkungen von OHE, synthetischem RF und 1mmol dbc-AMP besteht, nahmen GROOM und BOYNS (1973) an, daß der synthetische RF und OHE sowohl FSH als auch LH auf dem gleichen Weg wie c-AMP freisetzen.

Die Rolle von c-AMP als möglicher Vermittler der Releasingfaktorwirkung wurde u.a. von JUSTISZ und LLOSA (1969) untersucht. Diese Autoren stellten drei Bedingungen auf, die c-AMP erfüllen muß, wenn es eine Vermittlerrolle bei der biologischen Wirkung eines Hormons spielen soll:

- Unter der Releasingfaktorwirkung muß sich der c-AMP-Gehalt des Receptorgewebes erhöhen.
- Durch c-AMP muß die biologische Wirkung dieses Hormons nachgeahmt werden.
- Die Wirkung von c-AMP muß bei Anwesenheit von Phosphodiesterasehemmern zunehmen.

JUSTISZ und LLOSA (1969) beobachteten, daß c-AMP und FRF aus inkubierten Rattenhypophysen gleichviel FSH freisetzen können. Das Derivat Dibutyryl-c-AMP zeigt den gleichen Effekt mit vierfach geringerer Dosis. Der Phosphodiesterasehemmer Theophyllin konnte die Releasingfaktorwirkung auf die FSH-Freisetzung potenzieren. Die Untersuchungen von GROOM, COOKE und BOYNS (1971) zeigten, daß c-AMP eine signifikant stärkere Wirkung auf die FSH- und LH-Ausschüttung hat. Das Derivat Dibutyryl-c-AMP setzt FSH und LH im gleichen Umfang frei. Dibutyryl-c-AMP ist in vivo und in vitro wirk-

samer, wahrscheinlich aufgrund seiner Widerstandsfähigkeit gegenüber Phosphodiesterase und seinem leichteren Transport in die Zelle (ROBINSON et al. 1968).

ZOR, KANEKO, SCHNEIDER, McCANN und FIELD (1970) konnten nach Gabe von Schafshypothalamusextrakten eine vermehrte LH-Ausschüttung, eine Zunahme der c-AMP-Konzentration und der Adenylcyclaseaktivität in Rattenadenohypophysenkulturen feststellen. Hypothalamische Extrakte zeigten keine Wirkung auf die Phosphodiesterase und die ATP-ase. Bei Gabe des Phosphodiesterasehemmstoffes Theophyllin kam es zur Erhöhung der c-AMP-Konzentration im Hypophysenvorderlappen und zur Potenzierung der Hypothalamusextraktwirkung auf die c-AMP. Der LH-Release wurde bei diesen Versuchen jedoch nicht beeinflußt. Die gleichen Beobachtungen machten TANG und SPIES (1974) bei Gabe von synthetischem Releasingfaktor, bzw. Theophyllin und c-AMP in Monolayeradenohypophysenkulturen von Affen (Macaca fascicularis).

Die Bildung von c-AMP aufgrund von Hypothalamusextrakten wird durch die Abwesenheit von Calcium nicht beeinflußt. Das Fehlen einer Wirkung von Hypothalamusextrakt sowohl auf die Phosphodiesterase als auch auf die ATP-ase veranlaßte ZOR, KANEKO, SCHNEIDER, McCANN und FIELD (1970), eine direkte Wirkung auf die Adenylcyclaseaktivität zu postulieren.

3. Rezeptoren

Nach Implantation von Östrogenen in den Hypothalamus ist der LH-Gehalt (KANEMATSU und SAWYER, 1964) und der FSH-Gehalt (MARTINI et al. 1968) des Hypophysenvorderlappens vermindert. CHOWERS und McCANN (1965) nehmen an, daß für das Fehlen einer Gonadotropinsynthese nach intrahypothalamischer Östrogenimplantation ein Mangel an LH-RF an der Hypophyse verantwortlich ist. Werden die Östrogene dagegen in die Hypophyse implantiert, so ist eine

geringe LH-Freisetzung festzustellen. GROOM und BOYNS (1973) konnten nach einmaliger Gabe von 17-ß-Östradiol in menschliche foetale Adenohypophysenkulturen eine FSH-, nicht aber eine LH-Freisetzung feststellen. Testosteron und Progesteron ließen bei diesen Versuchen keine Wirkung auf die Gonadotropinausschüttung beobachten.

Aufgrund zahlreicher Versuche postuliert man heute im Hypothalamus und in der Hypophyse östrogensensible Rezeptoren. MICHAEL (1962) sowie KATO und VILLEE (1967) wiesen durch Autoradiographie Östrogenanreicherungen in der Eminentia mediana nach.

Die Ovarialhormone können den Hypophysenvorderlappen sowohl stimulieren als auch hemmen. Der sogenannte Hohlweg-Effekt (HOHLWEG, H. und JUNKMANN, K., 1932) beruht auf einer Stimulation, d.h. auf einem positiven feed-back: Eine einmalige Östrogeninjektion ruft eine Corpus-luteum-Bildung hervor.

SAWYER et al. (1949), FLERKO et al. (1957), DÖCKE und DÖRNER (1965) bestätigten eine Gonadotropininkretion durch Östrogene unter der Voraussetzung, daß das Hypophysen-Hypothalamus-System intakt war. Die Östrogene greifen dabei vorwiegend am Hypophysenvorderlappen an und erhöhen seine Sensibilität für die Releasingfaktoren. Bei den bis jetzt erwähnten Versuchen war die Östrogengabe einmalig und kurzfristig. Bei langfristiger Östrogengabe wird die hypophysäre Gonadotropininkretion gehemmt (MAHNERT, 1928). Auch PASCHKIS und RAKAFF (1950), PAESI und VAN REES (1960), sowie KINCL et al. (1961) als auch McCANN et al. (1962) konnten einen solchen negativen feed-back beobachten.

Auch bei Östron (DORFMANN und DORFMANN, 1963), Progesteron (McCANN und RAMIREZ, 1964) und Testosteron liegt eine negative Rückkopplung vor. GROOM und BOYNS (1973) beobachteten, daß die langfristige Gabe von Progesteron in Adenohypophysenkulturen die Stimulation der Gonadotropinfreisetzung durch Schafshypothalamusextrakte verhinderte. Die chronische Verabreichung von 17-ß-Östradiol ändert die Sensibilität gegenüber Schafshypothalamusextrakten jedoch nicht.

Durch exogen zugeführte Releasingfaktoren kann bei ovariektomierten, mit Östrogen und Progesteron blockierten Ratten eine Gonadotropininkretion aus dem Hypophysenvorderlappen ausgelöst werden (RAMIREZ und McCANN, 1963a). CORBIN (1966) und DAVID et al. (1966) implantierten LH in den Hypothalamus und stellten eine Hemmung der LH-Inkretion aus dem Hypophysenvorderlappen fest. Dagegen fand nach Implantation von LH in die Hypophyse oder in andere Hirnregionen keine LH-Freisetzung aus der Adenohypophyse statt. Ähnlich wie für die Östrogene vermutet man auch für LH Rezeptoren in der Eminentia mediana (CORBIN (1966) und CORBIN und COHEN, 1966). Die FSH-Implantation in den basalen Hypothalamus hat keinen Einfluß auf die LH-Inkretion.

Der Hypothalamus kontrolliert die LH-Ausschüttung wahrscheinlich auf zwei verschiedenen Wegen (BARRACLOUGH 1966):

- Das rostrale Zentrum in der präoptischen Region des Hypothalamus ist für die zyklische LH- und FSH-Ausschüttung zuständig, welche durch Östrogen und / oder Progesteron ausgelöst wird.
- Die mehr caudale Region im Nucleus-arcuatus-Eminentia-mediana-Gebiet ist für die basale Gonadotropinausschüttung verantwortlich und die sog. negative Rückkopplung der gonadalen Steroide wird wahrscheinlich hier vermittelt.

Diese Vorstellung wird durch zwei Experimente unterstützt: Erstens durch die Implantation gonadaler Steroide in verschiedene Gebiete des Hypothalamus und zweitens durch Einschnitte direkt hinter dem Chiasma opticum, welche zu dem gleichen Ergebnis wie suprachiasmatische Läsionen führen und das zyklische Zentrum außer Funktion setzen (HALASZ, B., 1969).

Die Regelung der Keimdrüsenfunktion geschieht über mindestens drei Regelkreise (BLOBEL und SCHLUMBERGER, 1967):

1. Ovar $\xrightarrow{\text{Steroid}}$ Hypothalamus $\xrightarrow{\text{RF}}$ HVL $\xrightarrow{\text{Gonadotropine}}$ Ovar

2. Ovar $\xrightarrow{\text{Steroid}}$ HVL $\xrightarrow{\text{Gonadotropine}}$ Ovar

3. HVL $\xrightarrow{\text{LH/FSH}}$ Hypothalamus $\xrightarrow{\text{RF}}$ HVL

III Der weibliche Zyklus als Regelkreissystem. Synopse der Zyklussteuerung (nach TAUBERT, 1975)

Gegen Ende der Lutealphase eines Zyklus beginnt eine neue Generation von Follikeln zu wachsen. Die damit begonnene Follikelphase des folgenden Zyklus endet mit der Ovulation. Das Follikelwachstum wird wahrscheinlich durch das tonische Sexualzentrum in Gang gebracht.

Der Untergang des Corpus luteum verursacht eine gesteigerte Gonadotropinausschüttung. Der vermehrt gebildete Releasingfaktor stimuliert die Synthese und Freisetzung von FSH. Das Corpus luteum des vorangegangenen Zyklus hemmt durch Östradiol und Progesteron lokal das Follikelwachstum. Deshalb können nur im Ovar der anderen Seite Follikel reifen.

Etwa sieben Tage nach der Menstruation kommt es zu einem steilen Anstieg der Östrogenproduktion. Dadurch wird das Follikelwachstum unterdrückt bis alle Follikel atretisch sind mit Ausnahme des einen, der den größten Wachstumsvorsprung besitzt. Der hohe Östrogenspiegel hemmt aufgrund des long-feed-back die FSH-RF-Ausschüttung am Hypothalamus.

Ab einer bestimmten Östradiolplasmakonzentration wird das zyklische Sexualzentrum in der präoptischen suprachiasmatischen Region aktiviert. Dieses wiederum löst den ovulatorischen Gipfel aus. Während des mittzyklischen LH-Gipfels findet in der auf LH ansprechenden Theka interna des sprungreifen Follikels eine Luteinisierung statt. Infolgedessen steigt die Progesteroninkretion an. Östradiol und Progesteron erreichen ihren zweiten Gipfel mit dem Höhepunkt des Corpus luteum. Damit fällt die FSH-Ausschüttung wieder ab.

IV Ausgangspunkt für den experimentellen Teil der Arbeit

FUXE und HÖKFELT (1969) entdeckten tubero-infundibuläre dopaminerge Neurone, deren Zellkörper im Nucleus arcuatus liegen, deren Axone jedoch an der Eminentia mediana enden und mit dem Portalkreislauf in Kontakt stehen. Diese Beobachtung legt den Verdacht nahe, daß Dopamin an der Kontrolle der adenohypophysären Inkretion beteiligt ist. Dopamin kann weder bei Perfusion durch ein isoliertes Portalgefäß noch in vitro eine Gonadotropinausschüttung aus der Hypophyse herbeiführen.

KAMBERI, SCHNEIDER und McCANN (1970) injizierten Dopamin in den dritten Ventrikel von Versuchstieren; SCHNEIDER und McCANN (1970) inkubierten Hypothalamusfragmente mit Dopamin. Beide Gruppen stellten eine deutliche gesteigerte FSH- und LH-Ausschüttung fest. Die höchste LH-Freisetzung beobachteten SCHNEIDER und McCANN (1970) bei weiblichen Tieren kurz vor der Ovulation oder nach Behandlung mit hohen Dosen von gonadalen Steroiden. Die Versuche von CRAMER und PORTER ergaben, daß Dopamin zu einer größeren Gonnadotropinfreisetzung fähig ist als Norepinephrin oder Epinephrin. Nach intraventrikulärer Gabe von Dopamin erscheint eine Releasingfaktorfreisetzung, auf die eine Gonadotropinausschüttung folgt (SCHNEIDER und McCANN, 1970; KAMBERI und MICAL, 1969).

Anders als auf die Gonadotropinfreisetzung kann Dopamin auf die Prolaktin-Freisetzung in vitro deutlich hemmend wirken. Es verhindert bei der in vitro inkubierten Hypophyse die Prolaktinfreisetzung (MAC LEOD, 1969); bei Perfusion eines hypophysären Portalgefäßes war diese Wirkung jedoch nicht festzustellen (KAMBERI, MICAL und PORTER, 1970).

Durch Studien mit Rezeptorenblockern und Substanzen, welche die Katecholaminsynthese beeinflussen, konnte die Bedeutung des Dopamins bei der Gonadotropinfreisetzung nur wenig bestätigt werden. Die Studien ließen eher an einen möglichen Einfluß von Norepinephrin denken.

McCANN, OJEDA, FAWCETT und KRULICH (1974) haben die Wirkung dieser Substanzen unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Beim normalen Tier folgt auf die Entfernung der Gonaden ein Anstieg der LH- und FSH-Ausschüttung aus der Hypophyse, weil die hemmende Wirkung der gonadalen Steroide nicht mehr vorhanden ist. Bei den Versuchen von OJEDA, KRULICH und McCANN (1973) waren Substanzen, welche die Katecholaminsynthese blockieren, genauso wie α - Blocker in der Lage, den Gonadotropinanstieg nach Kastration zu verhindern. Diese Blockade hing anscheinend mehr mit der Hemmung von Norepinephrin als mit der Synthese von Dopamin zusammen, besonders in Bezug auf LH, obwohl dafür keine Erklärung gefunden wurde. Der Dopaminrezeptorenblocker Pimozide^{R} verminderte teilweise die Antwort von FSH auf die Kastration. KALRA, P.S. und KALRA, S.P., KRULICH, FAWCETT und McCANN (1972) untersuchten die Fähigkeit von Progesteron, mit der normalen präovulatorischen Freisetzung der Gonadotropine zu interferieren. Dieselbe Untersuchung stellten KALRA, P.S. und McCANN (1973) mit Östrogen an. Schließlich werteten KALRA, S.P. und McCANN 1973 die Wirkungen von Progesteron und Östrogen auf einen durch hypothalamische Stimulation provozierten LH-Release aus. Diese Experimente ließen an eine mögliche Rolle von Norepinephrin bei der Vermittlung der Antworten denken.

Die Norepinephrinsynthese und der Progesteron-induzierte FSH- und LH-Release werden durch Diäthyldithiocarbamat oder U 146224 blokkiert. Diese Blockierung kann durch Dihydroxyphenylserin, welches den Block umgeht und die Norepinephrinsynthese wiederherstellt, rückgängig gemacht werden. Norepinephrinsynthesehemmer blockierten sowohl die Östrogen-stimulierte wie auch die normale präovulatorische Gonadotropinausschüttung.

Im Falle der Hypothalamusstimulation ergab die Blockierung der Norepinephrinsynthese einen Stillstand der LH-Ausschüttung, welche durch Stimulation der präoptischen Region hervorgerufen worden war, während der LH-Release infolge der Stimulation der Eminentia-mediana-

Nucleus-arcuatus-Region nicht beeinträchtigt wurde. McCANN, OJEDA, FAWCETT und KRULICH (1974) vermuten, daß im ersteren Fall präsynaptisch stimuliert wurde, während im zweiten Fall die Axonenden der RF-Neurone direkt stimuliert wurden. Wahrscheinlich liegt in der präoptischen Region eine noradrenerge Synapse und möglicherweise vermittelt die vermehrte Impulsrate, welche am Nachmittag des Proöstrus oder nach einer Steroidbehandlung über diese Synapse läuft, die darauffolgende Gonadotropinausschüttung. Zu dieser Vorstellung paßt auch die Tatsache, daß sich die Umsatzrate von Norepinephrin im vorderen Hypothalamus am Nachmittag des Proöstrus erhöht (DONOSO und DE GUTIERREZ, 1970). Vielleicht lösen dopaminerge Synapsen im Nucleus-arcuatus-Eminentia-mediana-Gebiet die Gonadotropin-Releasingfaktor-Freisetzung aus. Diese Synapse können in die Vermittlung des negativen feed-back der gonadalen Steroide eingeschaltet sein, da Östrogen die Dopamin-induzierte Freisetzung von LRF in vivo und in vitro hemmen kann (SCHNEIDER und McCANN , 1970). Diese postulierten Wirkungen von Dopamin und Norepinephrin lassen sich gut mit der anatomischen Lokalisation der Katecholamine vereinbaren (FUXE und HÖKFELT, 1969).

Schlußfolgerungen

- Die Katecholamine sind imstande, die Freisetzung von Gonadotropinen zu stimulieren und die von Prolaktin zu hemmen. Wahrscheinlich wird die Antwort der Gonadotropine auf hypothalamischer Ebene vermittelt, während die Antwort des Prolaktins sowohl auf hypothalamischer als auch auf hypophysärer Ebene vermittelt wird.

- Adrenerge Rezeptorenblocker können einerseits die Prolaktinfreisetzung fördern, auf der anderen Seite die Gonadotropinfreisetzung hemmen. Alpha-Rezeptorenblocker verhindern die Gonadotropinfreisetzung, während Pimozide, ein Dopaminrezeptorenblocker, die Prolaktinfreisetzung steigert.

- Die Hemmung der Katecholaminsynthese führt zu einer Hemmung der Gonadotropinfreisetzung und zu einer verstärkten Prolaktinfreisetzung.

- Bei der Verwendung von Substanzen, welche die Norepinephrin- bzw. die Dopaminsynthese entweder hemmen oder steigern, scheint Dopamin eine wichtige Rolle als inhibitorischer Transmitter zur Senkung der Prolaktinkonzentrationen zu spielen, während Epinephrin wahrscheinlich bei der Stimulation der Gonadotropinfreisetzung mitwirkt.

- Eine erhöhte Impulsentladungsfrequenz dürfte über die noradrenergen Synapsen in der präoptischen Region des Hypothalamus bei der Vermittlung der präovulatorischen Gonadotropinfreisetzung von Bedeutung sein.

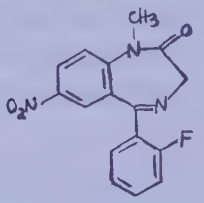
In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung des Benzodiazepinabkömmlings Flunitrazepam auf die Freisetzung von FSH und LH aus der Hypophyse untersucht.

SUPERSTINE und SULMAN veröffentlichten 1966 eine Arbeit, in der sie u.a. die Wirkung von Diazepam auf die FSH- und LH-Ausschüttung prüften. Die Methode zur Feststellung des FSH- und LH-Release bestand damals in der Beobachtung vaginaler Parameter sowie in der histologischen Untersuchung der Keimdrüsen.

In der vorliegenden Arbeit wie auch in der Arbeit von STOCK, K.-D. (1978) werden die FSH- und LH-Konzentrationen unter anderem radioimmunologisch nach der Doppelantikörpermethode bestimmt.

V Flunitrazepam als Faktor für den Gonadotropinrelease

Flunitrazepam ist ein Benzodiazepinderivat, das die typischen Wirkungsqualitäten der Benzodiazepine (siehe Tab. S. 19, PÖLDINGER 1967), wie z.B. Muskelrelaxation und Anxiolyse, besitzt.



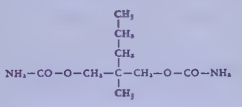
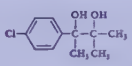
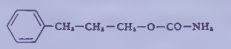
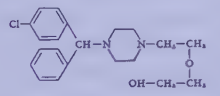
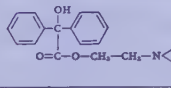
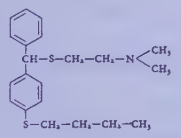
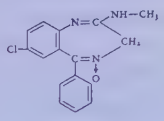
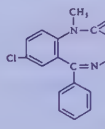
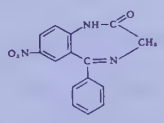
FLUNITRAZEPAM

Darüberhinaus weist Flunitrazepam jedoch eine stark schlafinduzierende Wirkung auf, weshalb es zur Zeit in der Anästhesiologie versuchsweise als Hypnotikum eingesetzt wird.

Die Tranquillantien im allgemeinen entfalten ihre Wirkung über das limbische System, welches das Affektverhalten und die vegetativen Organfunktionen beeinflußt.

Die Benzodiazepine im besonderen erhöhen die Krampfschwelle gegenüber elektrischer Reizung im Nucleus amygdaleus (COPER, 1975).

Da auch die Gonadotropinausschüttung aus der Hypophyse möglicherweise mit Impulsen aus dem limbischen System zusammenhängt, wird in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Flunitrazepam auf den Gonadotropin-Release untersucht.

Chemische Strukturformel	Chemische Kurzbezeichnung	Markenname	Durchschnittliche Tagesdosis	Indikationen	Begleiterscheinungen
2.1 *Glykol-Derivate*					
	Meprobamat	‹Aneural› ‹Biobamat› ‹Cyrpon› ‹Miltaun› ‹Miltown› ‹Pertranquil›	200–1200 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
	Phenaglycodol	‹Acalo› ‹Sinforil› ‹Ultran›	300–1500 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
2.2 *Carbinole*					
	Phenprobamat	‹Gamaquil›	400–1200 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
2.3 *Diphenylmethan-Derivate*					
	Hydroxyzin	‹Atarax›	30–75 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
	Benactyzin	‹Procalm› ‹Stoikon› ‹Suavitil›	3–6 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
	Captodiamin	‹Covatix›	150–450 mg	Angst- und Spannungszustände	Ataktische Störungen
2.4 *Benzodiazepin-Derivate*					
	Chlordiazepoxyd	‹Librium›	15–60 mg 100–300 mg	Angst- und Spannungszustände Alkoholpsychosen	Ataktische Störungen
	Diazepam	‹Valium› Roche	6–60 mg	Angst- und Spannungszustände, Insomnia	Ataktische Störungen
	Nitrazepam	‹Mogadan› Roche	5–20 mg (abends)	Insomnia	Ataktische Störungen

B FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Es sollte geprüft werden:

1. ob nach Injektion von Flunitrazepam LH und FSH aus der Hypophyse freigesetzt werden,
2. wenn ja, ob eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der injizierten Menge von Flunitrazepam und den freigesetzten LH- bzw. FSH-Aktivitäten besteht,
3. wie sich nach der Injektion einer bestimmten Menge von Flunitrazepam in Abhängigkeit von der Zeit die LH- bzw. FSH-Aktivitäten im Plasma und in der Hypophyse ändern.

C MATERIAL UND METHODE

I Nachweis der Gonadotropin-Releasing-Aktivität nach einer Modifikation der Methode von RAMIREZ und McCANN, 1963

RAMIREZ und McCANN fanden, daß ein Test mit ovariektomierten, Östrogen- und Progesteron blockierten Tieren empfindlicher ist, als ein Test mit nur ovariektomierten und Östrogen blockierten oder gar mit nur ovariektomierten Tieren. Als Versuchstiere dienen 200 g schwere weibliche Wistar-Ratten.

Arbeitsgang:

- Überprüfung der Geschlechtsreife durch Zykluskontrolle mit Hilfe von Vaginalabstrichen. Tiere ohne Zyklus werden ausgeschlossen.
- Bilaterale Ovariektomie in Äthernarkose
- Nach fünf Wochen Blockade des Hypothalamus der ovariektomierten Tiere mit 50 µg Östradiolbenzoat und 25 mg Progesteron durch getrennte subkutane Injektion in die Schenkelbeugen.
- 3 Tage nach der Blockade Injektion der Testsubstanz zusammen mit 500 E Heparin pro Tier in die Schwanzvene in Äthernarkose. Das injizierte Volumen beträgt 1 ml pro Versuchstier. Die Kontrollgruppe erhält unter den gleichen Bedingungen 1 ml 0,9 % NaCl-Lösung, die 500 E Heparin enthält.
- Entbluten der Tiere in Äthernarkose durch Punktion der Vena jugularis und Entnahme der Hypophysen.
- Zentrifugieren des Blutes
- Entnahme von 2 mal 500 µl aus dem Plasma jedes einzelnen Tieres für den späteren Immunologischen FSH- und LH-Nachweis.
- Poolen des restlichen Plasmas
- Aufteilung des gepoolten Plasmas in zwei Fraktionen für den biologischen LH- und FSH-Test.

- Einfrieren des Plasmas und der Hypophysen auf -20° C bis zur weiteren Aufarbeitung.

Materialien

- Weibliche Wistar-Ratten des Inzuchtstammes WU mit einem Gewicht von 200 g. Die Tiere, die von der medizinischen Versuchstierfarm S. Ivanovas, Kisslegg, Allgäu geliefert wurden, erhielten eine Standarddiät (Altromin K 15, Firma Altrogge, Lage, Lippe) und Wasser ad libidum.
- Östradiolbenzoat : Progynon B oleosum der Firma Schering AG, Berlin
- Progesteron : Progesteron Eifelfango der Firma Eifelfangos, Bad Neuenahr
- Heparin : Liquemin der Firma Hoffmann-La-Roche, Basel
- Flunitrazepam : Ro-Hypnol der Firma Hoffmann-La-Roche, Basel
- NaCl 0,9 %
- Äthanol

II FSH-Nachweis nach STEELMAN, S.M. und POHLEY, F.M. (1953)

POHLEY (1953) stellte fest, daß relativ hohe HCG-Dosen intakte infantile weibliche Ratten gegen exogenes FSH sensibilisieren, nicht aber gegen LH. Zwischen applizierter FSH-Menge und Ovargewichtszunahme besteht innerhalb gewisser Grenzen eine lineare Beziehung. POHLEY fand, daß, wenn man 10 - 50 I.U. HCG pro Tier spritzt, schon 0,1 - 0,2 mg FSH genügen, um einen gegenüber der HCG-Kontrolle signifikanten Anstieg des Ovargewichts zu erreichen. Die gleiche Menge FSH ohne HCG bewirkt keine Ovargewichtszunahme. POHLEY verwendete keine hypophysektomierten Tiere mehr, da er fest-

stellte, daß diese Tiere keine lineare Antwort auf die angewendeten FSH-Dosen gaben.

Prinzip

Sensibilisierung intakter infantiler weiblicher Ratten durch relativ hohe Dosen HCG für die Wirkung von FSH aufgrund einer linearen Beziehung zwischen der verabreichten FSH-Dosis und den Ovargewichten innerhalb gewisser Grenzen.

Arbeitsgang

- Zusammenfassung von 21 bis 22 Tage alten, zirka 40 g schweren infantilen weiblichen Wistarratten zu Gruppen von je 5 Tieren.
- Bei jeder Versuchsreihe laufen Gruppen mit, die 0,075 E und 0,0375 E S_2-FSH-Standard sowie Serum der Kontrolltiere enthalten.
- An 3 aufeinanderfolgenden Tagen werden im Abstand von 24 Stunden jedem Tier der entsprechenden Gruppe jeweils 13,3 I.U. HCG zusammen mit dem Testserum gespritzt. Das Volumen beträgt pro Tier und Applikation 1,5 ml (0,5 ml HCG-Lösung + 1,0 ml Testserum).
- 24 Stunden nach der letzten Injektion werden die Tiere mit Dichlormethan getötet und
  a) das Körpergewicht und das Gewicht der von Fett- und Bindegewebe befreiten Ovarien bestimmt und
  b) das Ovargewicht pro 100 g Tiergewicht errechnet.

  Die Zunahme des Ovargewichts pro 100 g Körpergewicht im Vergleich zur Kontrollgruppe dient als Maß für die FSH-Aktivität.

Materialien

- Weibliche infantile Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von 40 bis 45 g. Die Tiere wurden von der medizinischen Versuchstierfarm S. Ivanovas, Kisslegg/Allgäu geliefert und bekamen als Futter ausschließlich Äpfel, Möhren und getrocknetes Brot und Wasser ad libidum.
- HCG : (Primogonyl^{R} der Firma Schering AG, Berlin)
- NaCl 0,9 % : (Merck, Reag. Nr. 6404)
- NIH-FSH-S_2 : (National Institute of Health)
- Dichlormethan : (Merck, Reag. Nr. 6049)

III Aufarbeitung der Hypophysen nach einer Modifikation der Methode von PARLOW, A.F. (1964)

Prinzip

Mittels Aceton werden die Lipide aus den zerstoßenen Hypophysen herausgelöst. Das anschließend über Zwischenschritte gewonnene Hypophysentrockenpulver wird mit einem wässrigen Eiweißpuffer versetzt um das quantitativ zu bestimmende LH und FSH in Lösung zu bringen.

Arbeitsgang

- Auftauen der tiefgefrorenen Hypophysen
- Zugabe von 500 µl Aceton zu jeder einzelnen Hypophyse
- Zerstoßen der Hypophysen
- Schütteln auf Vortex
- Aufbewahrung bei +4°C für 48 Stunden
- Schütteln auf Vortex
- Abzentrifugieren
- Dekantieren des überstehenden Acetons

- Trocknen der Hypophysen bei Raumtemperatur
- Zugabe von 1 ml Puffer (1 % BSA, 0,01 M) zu jeder Hypophyse
- Schütteln auf Vortex
- Aufbewahrung bei + 4° C für 48 Stunden
- Schütteln auf Vortex
- Abzentrifugieren
- Abziehen des Überstandes und Aufteilung in 2 Fraktionen für den immunologischen LH- und FSH-Test.

IV Statistische Auswertung der Ergebnisse

1. Bestimmung der arithmetischen Mittelwerte
2. Berechnung der Standardabweichungen
3. Elimination von Werten, die außerhalb der zweifachen Standardabweichung liegen (= Ausschluß der Extrem- und Grenzwerte).
4. Varianzvergleich mit Hilfe des Fischer-Tests (F-Test)
5. Vergleich der Mittelwerte mit Hilfe des Student-Tests (t-Test) für unabhängige Stichproben.

Signifikanzniveaus: F-Test : $\alpha = 0{,}05 = 5$ % IW

t -Test : $2\alpha = 0{,}01 = 0{,}5$ % IW

V Bestimmung der FSH- und LH-Konzentrationen mit Hilfe des Radio-Immuno-Assay (RIA)

1. Prinzip des Radio-Immuno-Assay

Die Serumkonzentration der Glykoproteine FSH und LH ist sehr niedrig. Sie liegt im Bereich von 10^{-9} g pro ml. Außerdem unterscheiden sie sich in ihrem chemischen Aufbau nicht wesentlich von anderen Eiweißstoffen, so daß es fast unmöglich ist, sie auf chemischem Wege zu identifizieren.

Die genannten Schwierigkeiten lassen sich umgehen, wenn man auf die Antigeneigenschaften der beiden Hormone zurückgreift. Radioaktiv markiertes Antigen (Hormon) reagiert ebenso mit dem spezifischen Antikörper wie unmarkiertes Antigen. Beide Antigen konkurrieren gleich heftig um die Bindungsstelle am Antikörper.

Im Radio-Immuno-Assay wird diese Tatsache ausgenutzt.

Das mengenmäßig zu bestimmende unmarkierte Antigen (LH bzw. FSH) konkurriert mit einer konstanten Menge radioaktiv markierten Antigens (FSH bzw. LH) um den konstant im Unterschuß zugegebenen spezifischen Antikörper. Daher können nicht alle markierten und unmarkierten Antigene einen Platz am Antikörper finden; sie bleiben ungebunden.

Die Zeit, in der unmarkiertes und radioaktiv markiertes Antigen um die Bindung am Antikörper konkurrieren, ist die Inkubationszeit. Ihre Dauer hängt von der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung ab. Wenn das Gleichgewicht einmal erreicht ist, bleibt der prozentuale Anteil der markierten und unmarkierten Antigene im Antigen-Antikörperkomplex unverändert gleich. Die Trennung der Antigen-Antikörperkomplexe von den freien Antigenen erfolgt in unserem Fall durch immunologische Fällung, d.h. ein weiterer Antikörper richtet sich gegen den Antigen-Antikörperkomplex.

Nach einer erneuten Inkubationszeit wird der ausgefällte Antigen-Antikörperkomplex abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die im Präzipitat gebundene Radioaktivität wird gemessen. Bei konstanter Konzentration der Antikörper und der markierten Antigene (Tracer) und bei gleichzeitiger Erhöhung der unmarkierten Antigenkonzentration nimmt die Radioaktivität im Antigen-Antikörperkomplex ständig ab.

Zu einer Eichkurve gelangt man, wenn man die gemessene Aktivität des Präzipitats auf der y-Achse gegen die Konzentration der unmarkierten Antigene (FSH- bzw. LH-Standard) auf der x-Achse aufträgt. Um eine unbekannte Antigen-Konzentration zu bestimmen, kann man entweder die Standardkurve benutzen und direkt ablesen oder ein Rech-

nersystem zwischenschalten.

Damit ein Rechner die Standardkurve abspeichern kann, wird in unserem Fall der Kurvenverlauf durch eine Transformation annähernd linear und damit dem Rechner zugängig gemacht. Bei der mathematischen Annäherungsgleichung handelt es sich um die log-logit-Transformation nach DAVID RODBARD.

2. Durchführung des Radio-Immuno-Assay

a) Hormonmarkierung

Chloramin T-Methode, GREENWOOD u. Mitarbeiter 1963

Bei einer noch nicht in allen Einzelheiten geklärten Reaktionsfolge wird im möglichst kleinvolumigen Markierungsansatz das Jodnuklid ($Na^{*}J$) durch Chloramin T zu kationischem Jod ($^{*}J^{+}$) oxydiert, welches an Tyrosylresten des zugegebenen Proteins H-Atome substituiert.

Nicht proteingebundenes $^{*}J^{+}$ wird schließlich mit Na-disulfid reduziert. Die Reaktion hat ein pH-Optimum von 7,5 und vollzieht sich bei $4^{\circ}C$ 3-4 mal langsamer als bei Zimmertemperatur. Es werden im Gegensatz zu anderen Markierungstechniken nur geringe Proteinmengen (2 - 5 µg) und relativ niedrige Radioaktivitätsmengen (2 - 3 mCi) benötigt, um hohe spezifische Aktivitäten (z.B. bei Insulin bis zu 2700 mCi/µg) zu erhalten.

Nachteilig wirkt sich u.a. der direkte Kontakt eines Oxydationsmittels (Chloramin T) und hohen Konzentrationen von atomarem Jod mit dem Protein aus. So kann es zur Oxydation von Sulfhydrylgruppen bzw. oxydativer Sprengung von Disulfidbrücken zwischen Polypeptidketten oder Jodination von Histidin oder Tryptophanresten und damit zu irreversiblen Veränderung der Eiweißstruktur kommen, die sich im elektrophoretischen, sedimentativen, immunologischen und biologischen Verhalten manifestiert. Die Menge an

Chloramin T und die Reaktionszeit wird deshalb auf ein Mindestmaß reduziert.

Arbeitsgang

α Herstellung einer Sephadex-Säule:

- Bei einer serologischen 10 ml Glaspipette wird das Mundstück abgeschnitten und eine kleine Glasperle in die Pipettenspitzefallen lassen.
- Die Säule wird mit Sephadex G 75 bis zu einer Höhe von 10 cm gefüllt, nachdem man das Sephadex vorher bei Zimmertemperatur in Phosphatpuffer (0,01 M PO_4, 0,15 NaCl, pH 7,6) äquilibriert hat.
- Die Säule wird mit 1 ml Rinder-Serum-Albumin (2 % in Phosphatpuffer) überschichtet und dann mit Phosphatpuffer gewaschen.

β Jodierung von NIAMDD-Rat LH-I-3 und NIAMDD-Rat FSH-I-3:

20 µl 0,5 M Phosphatpuffer, pH 7,6 wird in die Jod-Ampulle (1 mCi J-125, Amersham Buchler IMS 30) gegeben.

Schütteln auf Vortex.

LH-I-3 bzw. FSH-I-3 (2 µg in 10 ul) wird zu dem Jod-Phosphatpuffer-Gemisch gegeben.

Schütteln auf Vortex.

20 ul Chloramin T (= 25 µg in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,6) wird dem Gemisch zugegeben.

60 sek. ständig schütteln auf Vortex.

50 µl $Na_2S_2O_5$ (= 125 µg in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 7,6) zugeben.

Schütteln auf Vortex.

Zugabe von 50 µl Transfer-solution (10 ml Transfer-solution enthalten 100 mg KJ, 1 mg Bromphenolblau und 1,6 g Saccharose)

Schütteln auf Vortex.

Das Ampullengemisch wird mit einer Pasteurpipette auf eine Sephadex-G-75-Säule gebracht.

Die Jod-Ampulle wird mit 50 µl Rinse-Solution gespült, und diese Lösung ebenfalls auf die Säule gegeben.

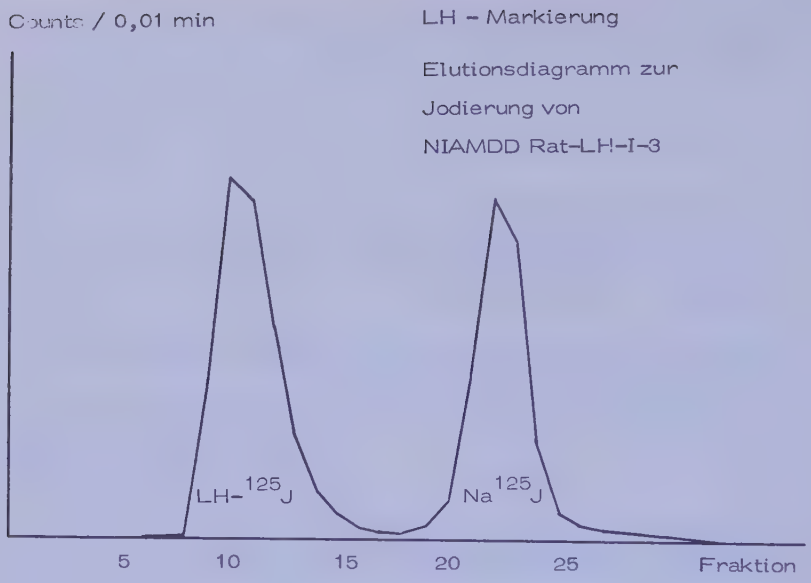
(10 ml Rinse-Solution enthalten 100 mg KJ, 1 mg Bromphenolblau und 0,8 g Saccharose)

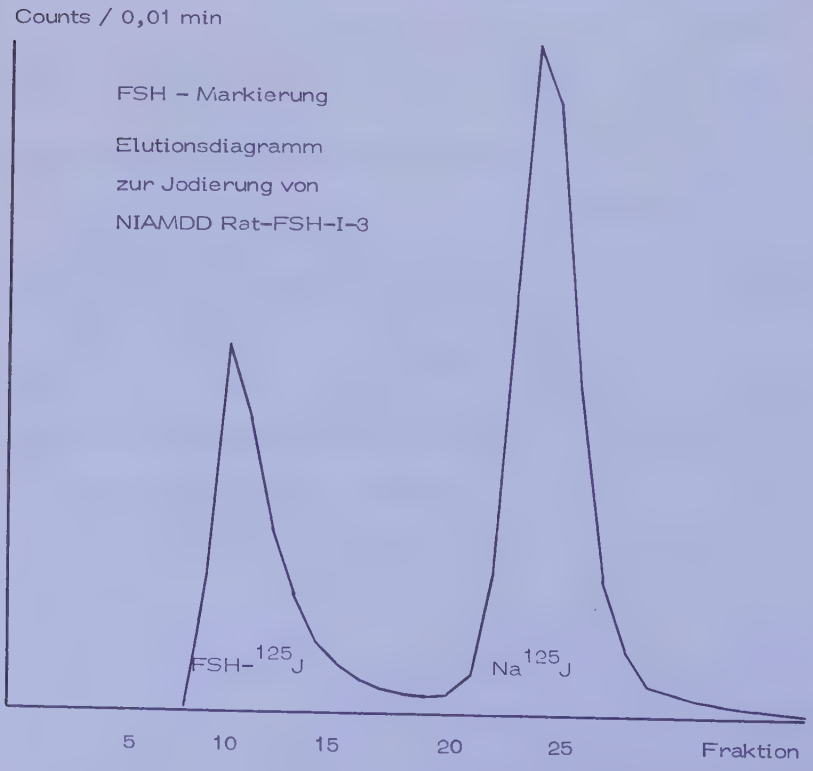
Je 0,5 ml Vorlage Phosphatpuffer in 35 Fraktionen.

Pro Röhrchen wird 0,5 ml Flüssigkeit aufgefangen.

Die einzelnen Fraktionen werden 0,01 min über dem Bohrloch des γ-Counters ausgezählt.

Zwei Gipfel der Radioaktivität werden festgestellt. Der erste Gipfel beginnt bei Fraktion 8 (8) und endet bei Fraktion 17 (18). Ein zweiter Gipfel, der u.a. freies ^{125}J enthält, beginnt bei Fraktion 19 (20). Das markierte Ratten-FSH findet sich im ersten Gipfel. Gewöhnlich enthält die Fraktion, die diesen Gipfel bildet, das am stärksten immunreaktive und am wenigsten beschädigte FSH. In unserem Fall trifft dies bei beiden Markierungen für Fraktion 10 zu. Die Fraktion 10 wird mit 0,1 % BSA/PBS - Puffer versetzt und so verdünnt, daß auf 100 µl 25000 cpm kommen.


Counts / 0,01 min
LH - Markierung
Elutionsdiagramm zur
Jodierung von
NIAMDD Rat-LH-I-3
LH-125J
Na125J
5
10
15
20
25
Fraktion


Counts / 0,01 min
FSH - Markierung
Elutionsdiagramm
zur Jodierung von
NIAMDD Rat-FSH-I-3
FSH-125J
Na125J
5
10
15
20
25
Fraktion

b) Erstellen einer Eichkurve

Um eine Eichkurve zu erstellen, werden 13 mal 3 Einwegröhrchen verwendet. Aus jedem Triplett wird nach Auszählung im γ-Counter das arithmetische Mittel gebildet.

- Die ersten Röhrchen (1a-c) dienen als "background" (BG) und bleiben leer.
- Die restlichen Teströhrchen (2a-13c) werden mit je 0,1 ml Tracer (NIAMDD-Rat LH-I-3 bzw. NIAMDD-Rat FSH-I-3) beschickt.
  Die Röhrchen 2a-c (TC) enthalten ausschließlich 0,1 ml Tracer. Sie werden im folgenden nur vom γ-Counter ausgezählt.
- In die Röhrchen 3a-c (NS) werden 0,7 ml, in 4a-c (BO) 0,5 ml und in die restlichen Röhrchen 0,4 ml Puffer (1% BSA, 0,01 M) pipettiert.
  Der Standard fehlt in den Röhrchen 4a-c (BO). Der erste Antikörper ist vorhanden. Der Ausdruck BO/TC mal 100 sagt etwas darüber aus, wie groß die Bindung (in %) zwischen Tracer und spezifischem Antikörper ist.
- Zugabe von 0,1 ml Standardlösung (2,5 bis 1000 ng NIAMDD-Rat LH-RP-I bzw. NIAMDD-Rat FSH-RP-I) in die Röhrchen 5a bis 13c (B1 - B9).
- Zugabe von 0,2 ml Antikörperlösung I (NIAMDD-Anti-Rat LH-S-3 bzw. NIAMDD-Anti-Rat FSH-S-6) in die Röhrchen 4a - 13c (B0 - B9).
  Die Einwegröhrchen 3a-c liefern den NS-Wert; ihnen fehlt der erste Antikörper. Der Zahlenwert von NS/TC mal 100 gibt an wie groß die unspezifische Bindung mit dem 2. Antikörper (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin) ist. Er soll maximal 5 % betragen.
- Durchschütteln der Teströhrchen.
- Erste Inkubation : t = 5 Tage
  T = $+4^{\circ}C$

- Zugabe von 0,2 ml Antikörperlösung II (Anti-Kaninchen-Gamma-globulin vom Esel, Titer 1:12).

- Zweite Inkubation : t = 2 Tage
  T = + 4°C

- Abzentrifugieren des Antigen-Antikörperkomplexes
  t = 120 min
  g = 2000

- Das Dekantieren muß innerhalb von 15 min nach dem Zentrifugieren erfolgen, da sich der Antigen-Antikörperkomplex sonst wieder vom Röhrchenboden löst.

- Messung der Radioaktivität des Präzipitats durch den γ-Counter. Die Zähldauer beträgt 3 min pro Röhrchen um eine ausreichende statistische Zählgenauigkeit zu erhalten.

Pipettierschema

Röhrchen-Nr. (a-c)		Puffer 1% BSA 0,01 M	Tracer FSH-I-3 bzw. LH-I-3	Standard FSH-RP-1 bzw. LH-RP-1 0,1 ml	1.Anti-K. FSH-S-6 bzw. LH-S-3	2.Anti-K. Anti-Kan. Gamma-globulin
BG	1	-	-	-	-	-
TC	2	-	0,1 ml	-	-	-
NS	3	0,7 ml	0,1 ml	-	-	0,2 ml
BO	4	0,5 ml	0,1 ml	-	0,2 ml	0,2 ml
B1	5	0,4 ml	0,1 ml	2,5ng	0,2 ml	0,2 ml
B2	6	0,4 ml	0,1 ml	5,0ng	0,2 ml	0,2 ml
B3	7	0,4 ml	0,1 ml	10,0ng	0,2 ml	0,2 ml
B4	8	0,4 ml	0,1 ml	25,0ng	0,2 ml	0,2 ml
B5	9	0,4 ml	0,1 ml	50,0ng	0,2 ml	0,2 ml
B6	10	0,4 ml	0,1 ml	100,0ng	0,2 ml	0,2 ml
B7	11	0,4 ml	0,1 ml	250,0ng	0,2 ml	0,2 ml
B8	12	0,4 ml	0,1 ml	500,0ng	0,2 ml	0,2 ml
B9	13	0,4 ml	0,1 ml	1000,0ng	0,2 ml	0,2 ml

Graphische Darstellung der Eichkurve

- Halblogarithmisch:

  x - Achse : Dosis, aufgetragen im logarithmischen Maßstab

  y - Achse : B/BO mal 100

  siehe Abb. a - c

- nach der logit-log-Transformation:

  x - Achse : Dosis, aufgetragen im logarithmischen Maßstab

  y - Achse : Einteilung in Logits (L)

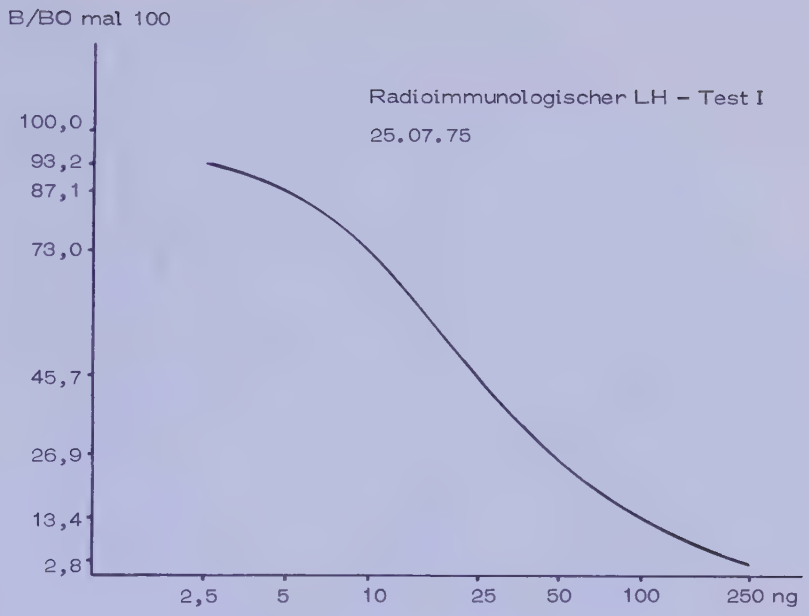
$$L = \frac{\ln y}{1 - y} \quad ; \qquad y = \frac{B}{BO}$$

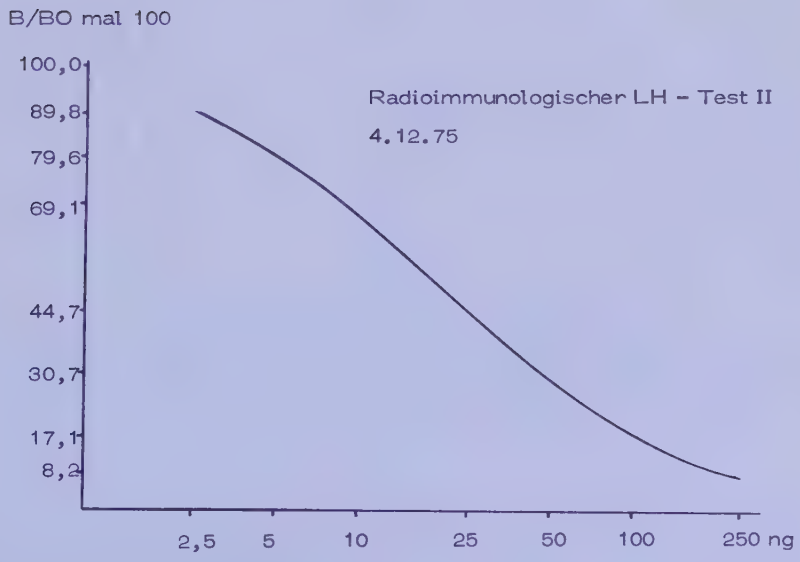
siehe Abb. d und e

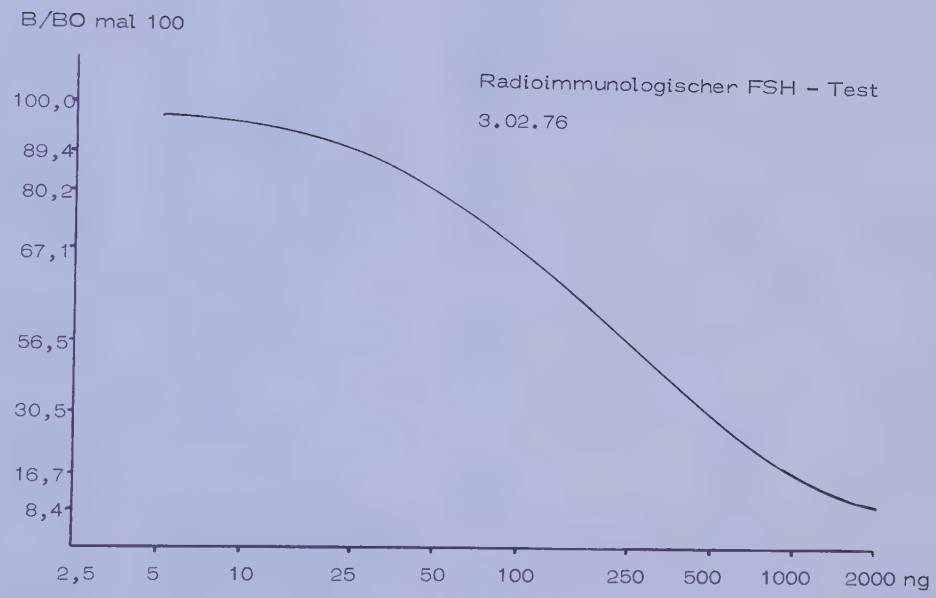
Anmerkung

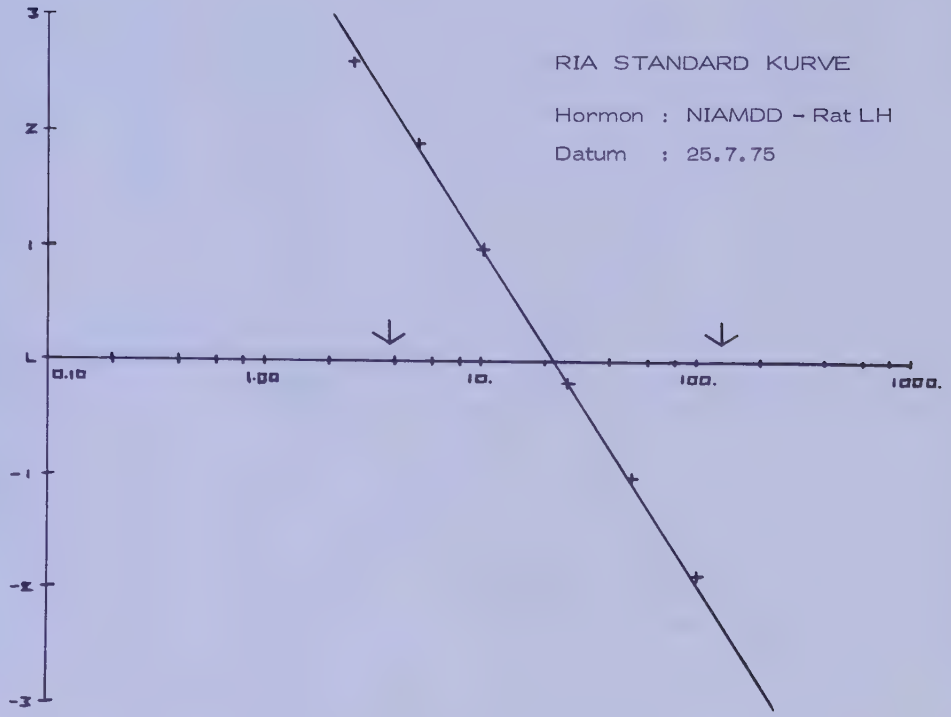
B = mittlere Count-Zahl bei einem Standard
BO = mittlere Count-Zahl ohne Antigen

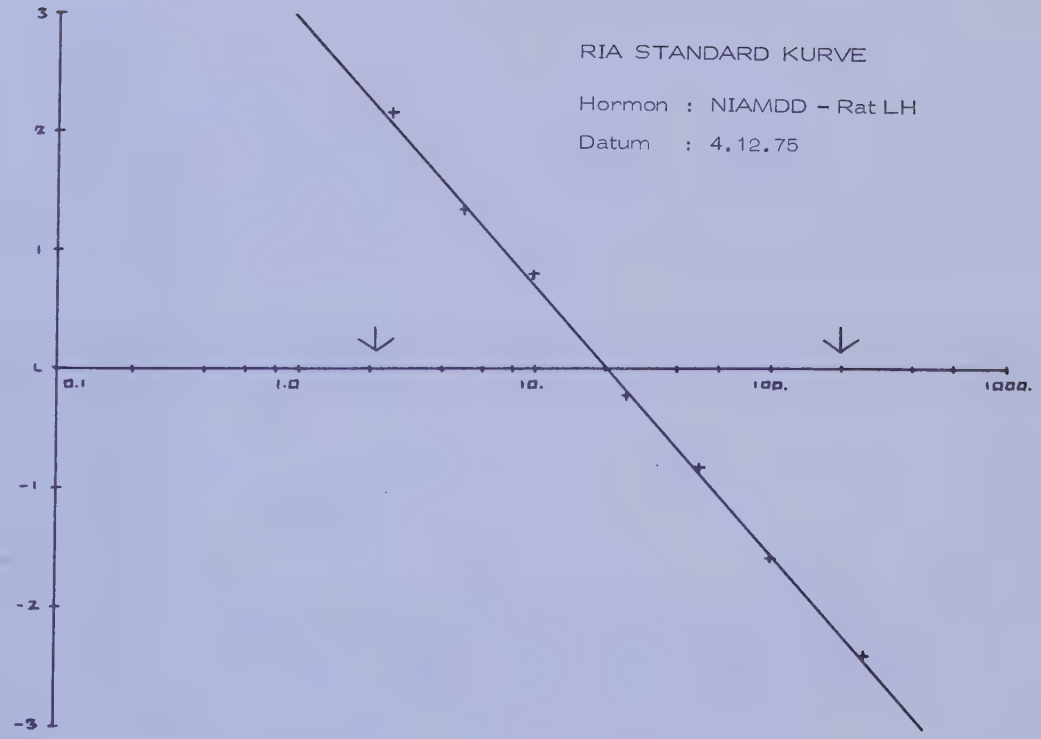
Nachdem für jeden B-Wert der entsprechende Logit-Wert gemäß der oben genannten Formel errechnet und in das Koordinatensystem übertragen ist, legt der Rechner eine Gerade annähernd durch die Punkte. Die Gerade ist durch Steigung und Schnittpunkt mit der x-Achse charakterisiert. Die eingegebenen x-Werte ($B_1 - B_9$) differieren etwas von den kalkulierten x-Werten der Gerade. Der Quotient D/X gibt diesen Fehler in % an; D = CX - X.


B/BO mal 100
Radioimmunologischer LH - Test I
25.07.75
100,0
93,2
87,1
73,0
45,7
26,9
13,4
2,8
2,5
5
10
25
50
100
250 ng


B/BO mal 100
Radioimmunologischer LH - Test II
4.12.75
100,0
89,8
79,6
69,1
44,7
30,7
17,1
8,2
2,5
5
10
25
50
100
250 ng


B/BO mal 100
Radioimmunologischer FSH - Test
3.02.76
100,0
89,4
80,2
67,1
56,5
30,5
16,7
8,4
2,5
5
10
25
50
100
250
500
1000
2000 ng


RIA STANDARD KURVE
Hormon : NIAMDD – Rat LH
Datum : 25.7.75
3
2
1
L
-1
-2
-3
0.10
1.00
10.
100.
1000.


RIA STANDARD KURVE
Hormon : NIAMDD – Rat LH
Datum : 4.12.75
3
2
1
0
-1
-2
-3
0.1
1.0
10.
100.
1000.

c) Bestimmung des FSH- bzw. LH-Gehalts der Testseren

Zur Auswertung der Seren werden pro Hormon keine Dreifachproben verwendet. Das arithmetische Mittel wird nur aus Doppelproben gebildet.

Arbeitsgang:

- Einpipettieren von 0,4 ml Puffer (1 % BSA, 0,01 M)
- Einpipettieren von 0,1 ml Tracer
  (NIAMDD-Rat LH-I-3 bzw. NIAMDD-Rat FSH-I-3)
- Einpipettieren von 0,1 ml Serum.
  Die einzelnen Plasmaproben wurden zuvor aufgetaut und zwei Minuten lang zentrifugiert um sie zu defibrinieren.
- Zugabe von 0,2 ml Antikörperlösung I
  (NIAMDD-Anti-Rat LH-S-3 bzw. NIAMDD-Anti-Rat FSH-S-6)
- Durchschütteln der Teströhrchen
- Erste Inkubation : t = 5 Tage
  T = + 4°C
- Zugabe von 0,2 ml Antikörperlösung II
  (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin vom Esel)
- Zweite Inkubation : t = 2 Tage
  T = + 4°C
- Abzentrifugieren : t = 120 min
  g = 2000
- Dekantieren
- Messung der Radioaktivität, Zähldauer: 3 min.

d) Bestimmung des FSH- bzw. LH-Gehalts der Hypophysen

Die tiefgefrorenen Hypophysenlösungen werden aufgetaut, zentrifugiert und mit einem 1 % Eiweißpuffer (1 % BSA, 0,01 M) 1:100 verdünnt. Der Arbeitsgang ist der gleiche wie bei der Bestimmung des FSH- bzw. LH-Gehalts der Testseren mit der Ausnahme, daß statt dem Serum Hypophysenlösung verwendet wird. Aus der 1:100 Verdünnung wird für den LH-Test 10 µl und für den FSH-Test 100 µl Hypophysenlösung entnommen.

3. Materialien

EDTA Titriplex III	(Merck Reag. Nr. 8418)
$Na_2HPO_4\ 2\ H_2O$	(Merck Reag. Nr. 6580)
KH_2PO_4	(Merck Reag. Nr. 4873)
NaCl	(Merck Reag. Nr. 6404)
NaN_3	(Merck Reag. Nr. 6688)
$Na_2S_2O_5$	(Merck Reag. Nr. 6528)
Chloramin T	(Merck Reag. Nr. 2426)
KJ	(Merck Reag. Nr. 5043)
Bromphenolblau	(Merck Reag. Nr. 8122)
Saccharose	(Merck Reag. Nr. 7653)
BSA	(Behring Werke Marburg)
NRS	(Wellcome Beckenham England)
Anti Rabbit Precipitating Serum (Donkey) = Doppelantikörper	(Wellcome Beckenham England)
Sephadex G-75	(Pharmacia Fine Chemical AB Uppsala Schweden)
^{125}J als NaJ IMS - 30	(Amersham Buchler, Frankfurt/Main)
Teströhrchen 10 x 75 mm	(Sarstedt Nümbrecht-Rommelsdorf, Best.-Nr. 7511)

* Gereinigtes Ratten-LH zur Radiojodierung	(NIAMDD-Rat LH I-3)
* Gereinigtes Ratten-FSH zur Radiojodierung	(NIAMDD-Rat FSH I-3)
* Anti-Serum	(NIAMDD-Anti-Rat LH-S-3) (NIAMDD-Anti-Rat FSH-S-6)

* Diese Substanzen wurden freundlicherweise vom Nation Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Disease, National Institutes of Health, Rat Pituitary Hormone Distribution Program zur Verfügung gestellt.

D ERGEBNISSE

Testgruppe 1: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,250 mg (= 250 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 2: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,125 mg (= 125 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 3: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,0625 mg (= 62,5 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 4: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,03125 mg (= 31,25 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 5: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,015625 mg (= 15,625 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 6: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,250 mg (= 250 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 7: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,125 mg (= 125 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 8: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,0625 mg (= 62,5 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 9: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,03125 mg (= 31,25 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 10: Zeitliche Abhängigkeit (Kinetik) der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen nach intravenöser Injektion von 0,015625 mg (= 15,625 µg) Flunitrazepam.

Testgruppe 1: LH-Immunoassay, Kinetik bei 250 µg Flunitrazepam

Tabellen 1 und 2 sowie die Abbildungen 1 und 2 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,250 mg (= 250 µg) Flunitrazepam.

Die mittleren LH-Serumwerte liegen mehrheitlich signifikant unter der mittleren Serumkontrolle. Die mittleren LH-Hypophysenkonzentrationen liegen bei den verschiedenen Zeiten meist über der Kontrolle, wobei sich hier im Vergleich zum Serum eine kleinere Zahl von signifikanten Werten ergab.

Aus Abbildung 1 geht hervor, daß die LH-Serumkonzentrationen zwischen 10 und 120 Minuten post injectionen zunächst abfallen, um sich dann zwischen 120 und 270 Minuten p.i. wieder auf etwas höhere Werte einzupendeln.

Die Hypophysenwerte in Abbildung 2 bewegen sich bis 150 min. p.i. auf einem Niveau, das größtenteils signifikant oberhalb der Kontrolle liegt und fallen zwischen 150 und 270 Minuten zum Kontrollbereich hin ab.

Den relativ niedrigen Serumkonzentrationen zwischen 10 und 120 Minuten stehen erhöhte Hypophysenwerte zwischen 10 und 150 Minuten gegenüber, während den etwas höheren Serum-LH-Werten zwischen 120 und 270 Minuten niedrigere Hypophysenkonzentrationen zwischen 150 und 270 Minuten entsprechen.

Tabelle 1:
LH-Immunoassay, Kinetik bei 250 µg Flunitrazepam
Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	19	158,2	±	52,0	
250	10	10	172,9	±	138,4	-
250	15	12	93,6	±	42,8	+
250	30	11	93,6	±	70,2	+
250	45	11	97,8	±	45,3	+
250	60	12	83,5	±	26,7	+
250	90	11	93,8	±	54,6	+
250	120	8	73,1	±	14,2	+
250	150	11	125,0	±	40,5	-
250	180	10	94,0	±	40,0	+
250	210	12	100,9	±	41,1	+
250	240	11	121,5	±	33,5	-
250	270	11	105,1	±	26,1	+

Tabelle 2:
Hypophysen

			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	15	1184,5	±	183,0	
250	10	11	1593,4	±	508,1	-
250	15	11	1931,0	±	296,1	+
250	30	11	1506,0	±	289,8	+
250	45	12	1772,6	±	370,9	+
250	60	11	1705,3	±	243,7	+
250	90	10	1264,6	±	416,2	-
250	120	10	1227,9	±	274,2	-
250	150	9	1580,0	±	273,0	+
250	180	10	1294,7	±	160,8	-
250	210	9	1271,8	±	341,4	-
250	240	11	1323,4	±	187,7	-
250	270	10	1225,1	±	217,7	-

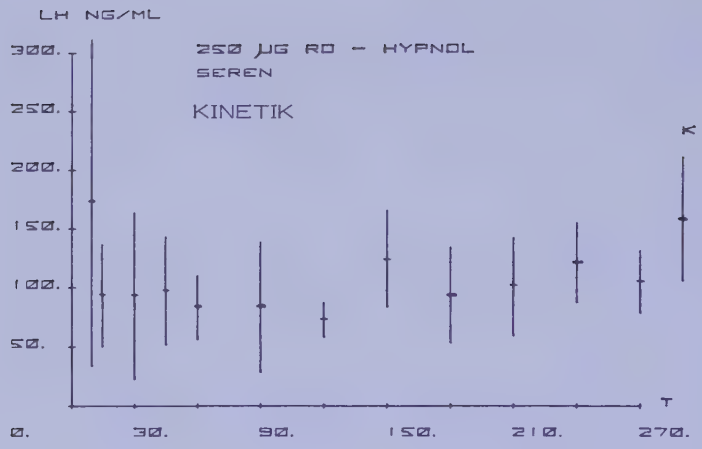


Abbildung 1:

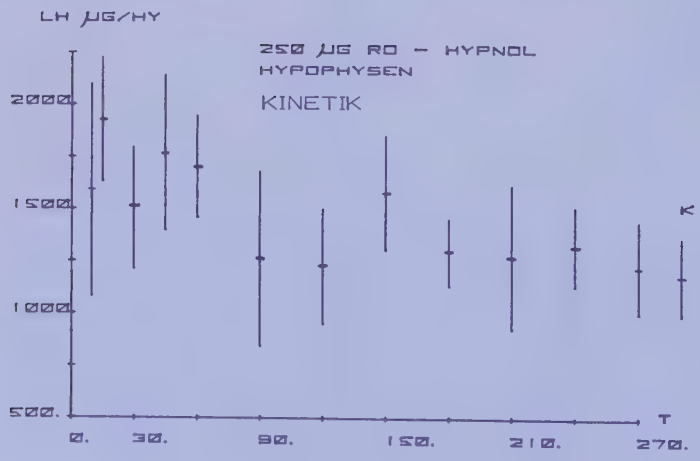


Abbildung 2:

Testgruppe 2: LH-Immunoassay, Kinetik bei 125 µg Flunitrazepam

Tabelle 3 und 4 sowie die Abbildungen 3 und 4 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,125 mg (= 125 µg) Flunitrazepam.

Die mittleren LH-Serumwerte liegen mehrheitlich unter der mittleren Serumkontrolle, wenn auch nicht signifikant. Die mittleren LH-Hypophysenkonzentrationen liegen sämtlich über der Kontrolle, teilweise sogar signifikant.

Wie aus den Abbildungen 3 und 4 zu ersehen ist, läßt der LH-Gehalt sowohl des Serums als auch der Hypophysen keine deutliche Zeitabhängigkeit erkennen.

Den größtenteils erniedrigten LH-Serumkonzentrationen stehen erhöhte Hypophysenkonzentrationen gegenüber.

Tabelle 3:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 125 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-9}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	19	158,2	±	52,0	
125	10	7	159,8	±	49,9	-
125	15	7	145,1	±	49,7	-
125	30	7	155,3	±	43,6	-
125	45	7	143,6	±	37,1	-
125	60	7	126,5	±	21,5	-
125	90	7	143,3	±	37,1	-
125	120	7	163,1	±	28,6	-

Tabelle 4:

Hypophysen			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	15	1184,5	±	183,0	
125	10	7	1435,8	±	289,5	-
125	15	7	1450,8	±	219,0	+
125	30	6	1449,0	±	206,9	+
125	45	5	1232,9	±	89,0	-
125	60	6	1386,6	±	175,5	-
125	90	6	1362,9	±	273,0	-
125	120	7	1627,8	±	417,1	+

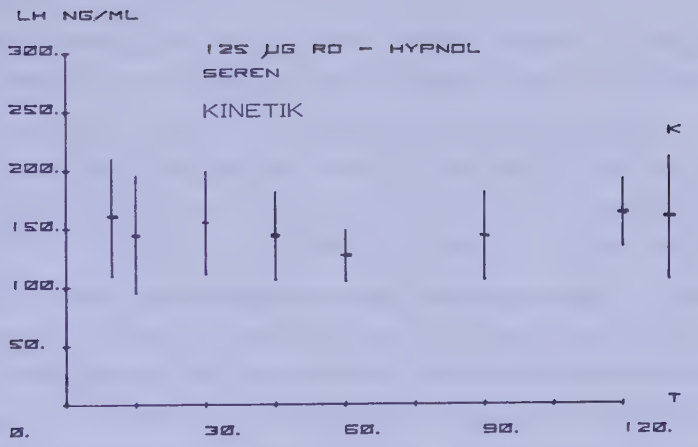


Abbildung 3:

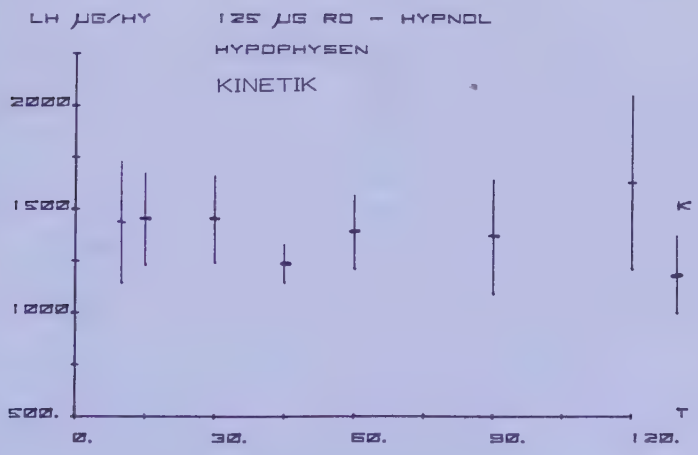


Abbildung 4:

Testgruppe 3: LH-Immunoassay, Kinetik bei 62,5 µg Flunitrazepam

Tabelle 5 und 6 sowie die Abbildungen 5 und 6 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,0625 mg (= 62,5 µg) Flunitrazepam.

Alle mittleren LH-Serumwerte liegen unterhalb der Kontrolle, jedoch nicht signifikant. Die mittleren LH-Hypophysenkonzentrationen liegen sämtlich oberhalb des Kontrollwertes. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle gegeben.

Abbildung 5 läßt keine deutliche Zeitabhängigkeit des LH-Serumgehaltes erkennen. Auch die LH-Hypophysenkonzentrationen in Abbildung 6 bewegen sich offensichtlich unabhängig von der Zeitdauer post injectionem um einen Wert knapp oberhalb der Kontrolle.

Den erniedrigten LH-Spiegeln im Serum entsprechen erhöhte LH-Konzentrationen in den Hypophysen.

Tabelle 5:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 62,5 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	19	158,2	±	52,0	
62,5	10	7	137,9	±	49,9	-
62,5	15	6	109,1	±	28,8	-
62,5	30	7	132,3	±	62,2	-
62,5	45	7	129,1	±	21,8	-
62,5	60	7	112,3	±	31,4	-
62,5	90	6	110,3	±	24,0	-
62,5	120	7	119,5	±	22,7	-

Tabelle 6:

Hypophysen			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	15	1184,5	±	183,0	
62,5	10	7	1324,0	±	332,1	-
62,5	30	7	1438,2	±	348,3	-
62,5	45	6	1416,6	±	257,4	-
62,5	90	5	1525,8	±	349,1	-

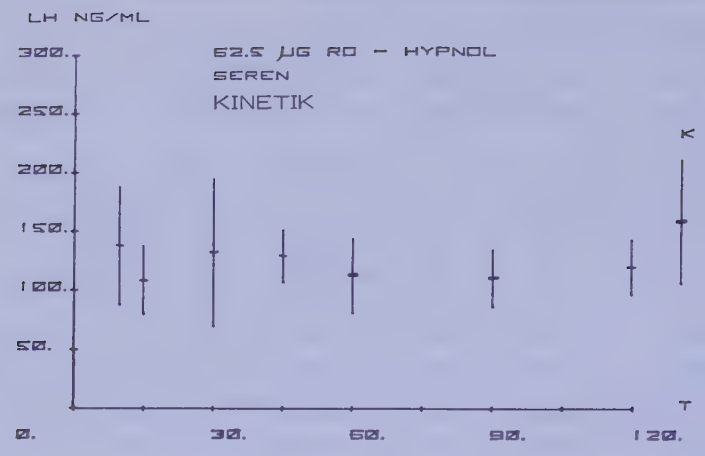


Abbildung 5:

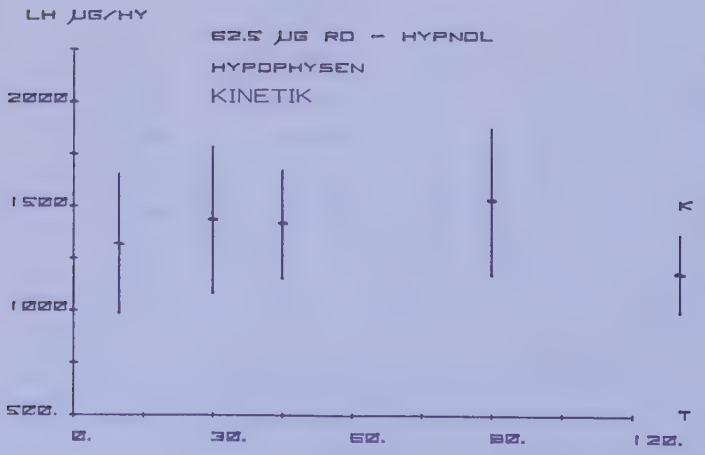


Abbildung 6:

Testgruppe 4: LH-Immunoassay, Kinetik bei 31,25 µg Flunitrazepam

Die Tabellen 7 und 8 sowie die Abbildungen 7 und 8 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,03125 mg (= 31,25 µg) Flunitrazepam.

Alle mittleren LH-Serumwerte liegen unterhalb der Kontrolle, mehr als die Hälfte weicht sogar signifikant vom Kontrollwert ab. Die LH-Hypophysenkonzentrationen liegen sämtlich über dem Kontrollwert; auch hier sind die meisten Werte signifikant verändert.

Wie aus den Abbildungen 7 und 8 zu erkennen ist, weist weder der LH-Gehalt des Serums noch der der Hypophysen eine deutliche Zeitabhängigkeit auf.

Den erniedrigten LH-Serumkonzentrationen entsprechen erhöhte Hypophysenkonzentrationen.

Tabelle 7:

LH-Immunoassay, Kinetik bei 31,25 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6} g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9} g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	19	158,2	±	52,0	
31,25	10	7	138,5	±	44,2	-
31,25	15	7	112,9	±	21,1	+
31,25	30	6	110,7	±	20,3	+
31,25	45	7	117,0	±	17,6	-
31,25	60	7	88,1	±	20,1	+
31,25	90	6	115,3	±	34,6	-
31,25	120	7	91,9	±	19,8	+

Tabelle 8:

Hypophysen			$\bar{x}$ (10^{-6} g/Hy)			
phys.NaCl	30	15	1184,5	±	183,0	
31,25	15	6	1405,1	±	297,3	-
31,25	30	6	1833,1	±	293,3	+
31,25	60	6	1566,1	±	221,2	+
31,25	90	6	1672,8	±	309,9	+
31,25	120	7	1435,7	±	259,0	-

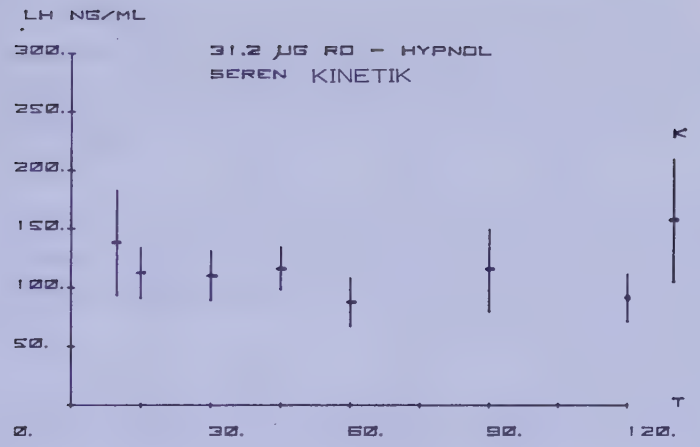


Abbildung 7:

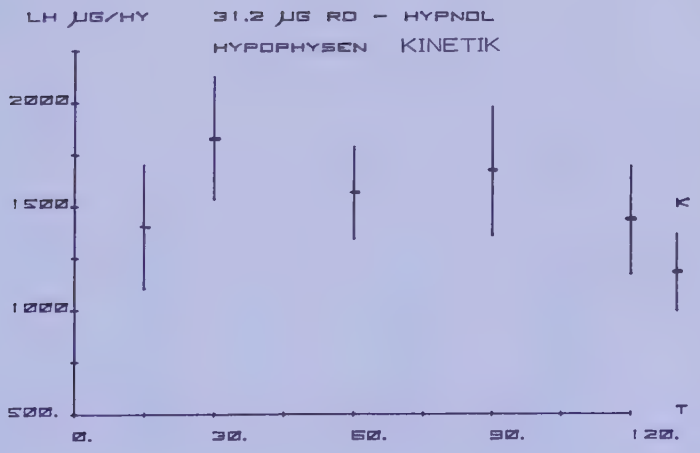


Abbildung 8:

Testgruppe 5: LH-Immunoassay, Kinetik bei 15,625 µg Flunitrazepam

Die Tabellen 9 und 10 sowie die Abbildungen 9 und 10 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,015625 mg (= 15,625 µg) Flunitrazepam.

Die mittleren LH-Serumwerte liegen alle unterhalb des Kontrollwertes, mehr als die Hälfte weist sogar eine signifikante Abweichung auf. Die LH-Hypophysenwerte bewegen sich alle oberhalb der Kontrolle, wenn auch nicht signifikant.

Die Abbildungen 9 und 10 lassen weder bei den LH-Serum- noch bei den LH-Hypophysenkonzentrationen eine zeitliche Abhängigkeit erkennen.

Den erniedrigten LH-Serumkonzentrationen stehen erhöhte LH-Hypophysenkonzentrationen gegenüber.

Tabelle 9:
LH-Immunoassay, Kinetik bei 15,625 µg Flunitrazepam
Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	19	158,2	±	52,0	
15,625	10	9	100,5	±	60,5	-
15,625	15	10	122,5	±	61,8	-
15,625	30	11	99,2	±	32,5	+
15,625	45	12	108,1	±	35,8	+
15,625	60	11	112,0	±	45,4	-
15,625	90	12	89,6	±	24,9	+
15,625	120	11	152,2	±	81,6	-
15,625	150	11	116,8	±	21,8	+
15,625	180	8	97,5	±	18,1	+
15,625	210	11	101,3	±	19,6	+
15,625	240	12	113,5	±	34,6	-
15,625	270	9	103,7	±	26,0	+

Tabelle 10:
Hypophysen

			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	15	1184,5	±	183,0	
15,625	10	7	1370,6	±	254,2	-
15,625	15	10	1384,3	±	407,9	-
15,625	30	12	1293,1	±	301,7	-
15,625	45	8	1553,2	±	529,1	-
15,625	60	12	1558,1	±	294,9	+
15,625	90	12	1602,7	±	435,6	-
15,625	120	11	1404,1	±	433,2	-
15,625	150	12	1383,5	±	319,8	-
15,625	180	11	1113,4	±	346,6	-
15,625	210	10	1199,4	±	288,9	-
15,625	240	11	1402,8	±	246,7	-
15,625	270	10	1353,8	±	350,3	-

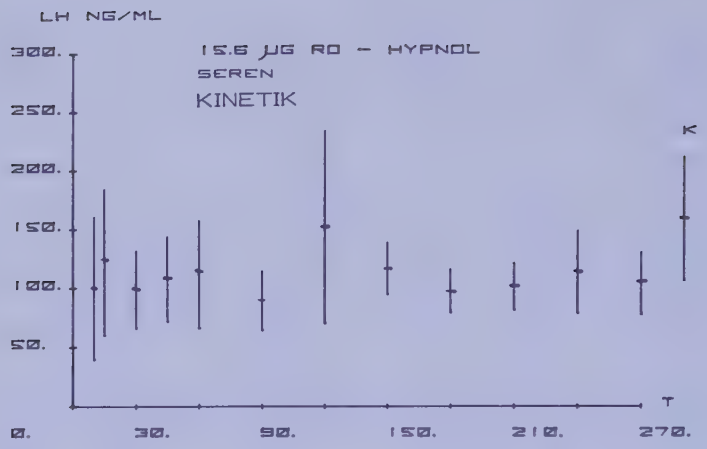


Abbildung 9:

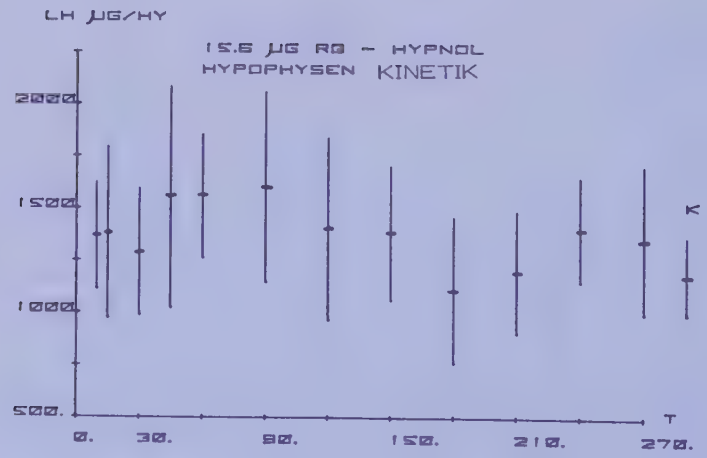


Abbildung 10:

Testgruppe 6: FSH-Test, Kinetik bei 250 µg Flunitrazepam

a) immunologische Auswertung

Die Tabellen 11 und 12 sowie die Abbildungen 11 und 12 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter, Östrogen-Progesteron blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,250 mg (= 250 µg) Flunitrazepam.

Die mittleren FSH-Serumwerte liegen größtenteils oberhalb des Kontrollwertes. Auch die mittleren FSH-Hypophysenkonzentrationen sind fast alle höher als die Kontrollwerte.

Aus Abbildung 11 geht hervor, daß die FSH-Serumkonzentrationen zwischen 10 und 90 Minuten post injectionem um ein Niveau pendeln, das signifikant oberhalb der Kontrolle liegt, während sich die Werte zwischen 120 und 270 Minuten p.i. knapp, jedoch nicht signifikant unterhalb der Kontrolle bewegen.

In Abbildung 12 ist zu erkennen, daß die FSH-Hypophysenkonzentrationen zwischen 90 und 120 Minuten p.i., wenn auch größtenteils über dem Kontrollwert, so doch in einem tieferen Bereich liegen als die Werte zwischen 150 und 270 Minuten post injectionem.

Den signifikant erhöhten FSH-Serumkonzentrationen zwischen 10 und 90 Minuten p.i. entsprechen Hypophysenwerte, welche zwar über der Kontrolle, jedoch in einem relativ niedrigen Bereich liegen. Den im Vergleich zu vorher erniedrigten FSH-Serumwerten zwischen 120 und 270 Minuten stehen gegenüber vorher erhöhte FSH-Hypophysenkonzentrationen zwischen 150 und 270 Minuten p.i. gegenüber.

b) biologische Auswertung

Aus Abbildung 13 geht hervor, daß alle FSH-Serumkonzentrationen über dem Kontrollwert liegen, zum Teil sogar signifikant. Eine zeitliche Abhängigkeit ist nicht zu erkennen.

Tabelle 11:
FSH-Immunoassay, Kinetik bei 250 µg Flunitrazepam
Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	20	2292,3	±	249,7	
250	10	12	3135,8	±	577,0	+
250	15	12	2898,7	±	566,9	+
250	30	12	2601,3	±	403,5	-
250	45	12	2902,6	±	518,4	+
250	60	12	3129,9	±	481,1	+
250	90	12	3047,7	±	439,3	+
250	120	10	1943,9	±	292,4	+
250	150	9	2223,7	±	381,4	-
250	180	9	2229,3	±	379,1	-
250	210	10	2262,5	±	341,7	-
250	240	11	2406,9	±	420,8	-
250	270	11	2120,7	±	344,5	-

Tabelle 12:
Hypophysen

			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	20	312,0	±	162,6	
250	10	12	424,3	±	197,3	-
250	15	11	377,0	±	83,7	-
250	30	12	342,3	±	84,3	-
250	45	12	444,8	±	79,3	+
250	60	11	439,8	±	59,8	+
250	90	12	293,6	±	131,6	-
250	120	9	304,2	±	69,9	-
250	150	12	687,9	±	326,5	+
250	180	12	500,5	±	258,7	-
250	210	12	432,8	±	278,4	-
250	240	11	641,3	±	218,5	+
250	270	11	826,3	±	219,7	+

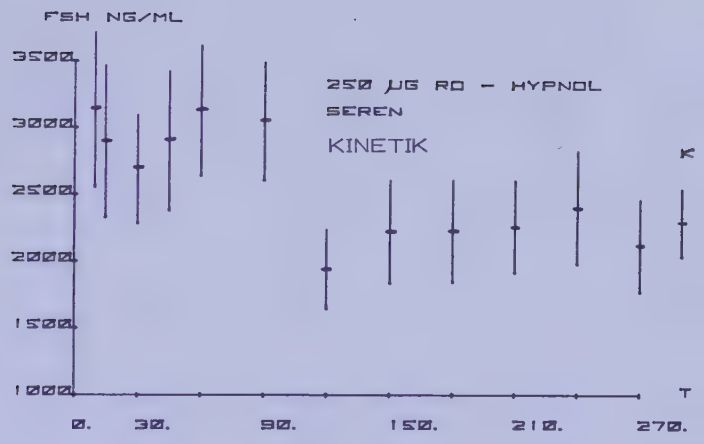


Abbildung 11:

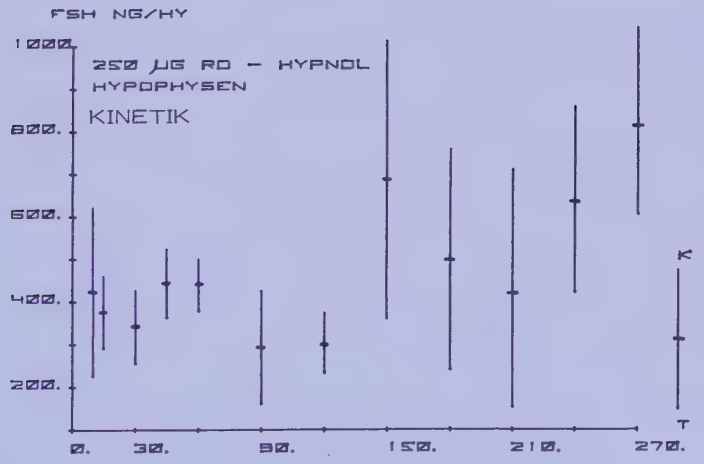


Abbildung 12:

Tabelle 13:

FSH-Biologische Tests, Kinetik bei 250 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	mg OG / 100 g TG	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	22	87,0	±	109,0	
0,375 E	30	25	125,3	±	25,6	
S - FSH						
0,075 E	30	25	176,4	±	34,4	
S - FSH						
250	10	5	114,3	±	16,3	+
250	15	5	100,6	±	12,5	-
250	30	5	121,3	±	25,5	-
250	45	5	121,1	±	21,1	-
250	60	5	135,3	±	25,0	-
250	90	5	121,2	±	20,9	-
250	120	5	115,5	±	13,4	+

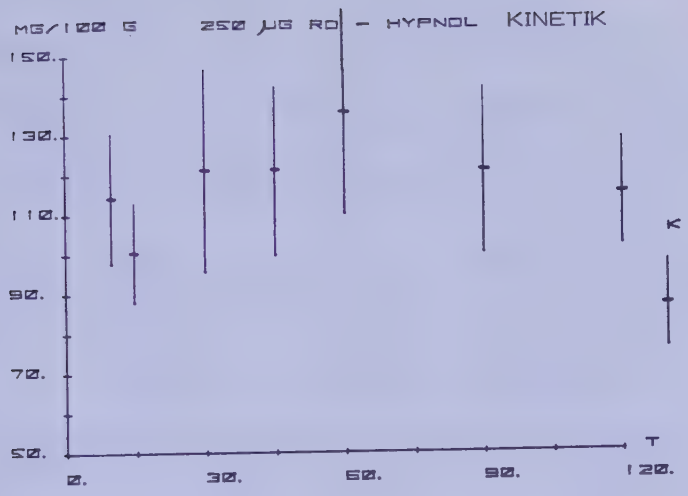


Abbildung 13:

Testgruppe 7: FSH-Test, Kinetik bei 125 µg Flunitrazepam

a) immunologische Auswertung

Die Tabellen 14 und 15 sowie die Abbildungen 14 und 15 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter, Östrogen-Progesteron blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,125 mg (= 125 µg) Flunitrazepam.

Die mittleren FSH-Serumwerte liegen größtenteils unter dem Kontrollwert. Die mittleren FSH-Hypophysenkonzentrationen liegen alle unterhalb des Kontrollwertes. Sowohl die Serum- als auch die Hypophysenwerte sind überwiegend nicht signifikant.

Die Abbildungen 14 und 15 lassen weder bei den FSH-Serum- noch bei den FSH-Hypophysenkonzentrationen eine zeitliche Abhängigkeit erkennen.

Den größtenteils nicht signifikant - gegenüber der Kontrolle erniedrigten Serum-FSH-Konzentrationen stehen nur in zwei Fällen signifikant erniedrigte Hypophysenwerte gegenüber.

b) biologische Auswertung

Aus Abbildung 16 geht hervor, daß alle FSH-Serumkonzentrationen über dem Kontrollwert liegen, wobei in etwa einem Drittel der Fälle eine Signifikanz besteht. Eine klare zeitliche Abhängigkeit ist nicht zu erkennen.

Tabelle 14:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 125 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	20	2292,3	±	249,7	
125	10	7	2253,1	±	571,3	-
125	15	7	1649,3	±	212,1	+
125	30	7	2415,2	±	622,6	-
125	45	7	1998,8	±	661,1	-
125	60	7	1933,3	±	421,0	-
125	90	7	2274,7	±	451,8	-
125	120	7	2778,3	±	496,3	-

Tabelle 15:

Hypophysen			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	20	312,0	±	162,6	
125	10	7	203,0	±	71,8	-
125	15	7	206,5	±	57,8	-
125	30	5	234,8	±	66,9	-
125	45	6	147,7	±	32,8	+
125	60	7	190,1	±	96,2	-
125	90	5	227,9	±	50,8	-
125	120	7	174,2	±	47,4	+

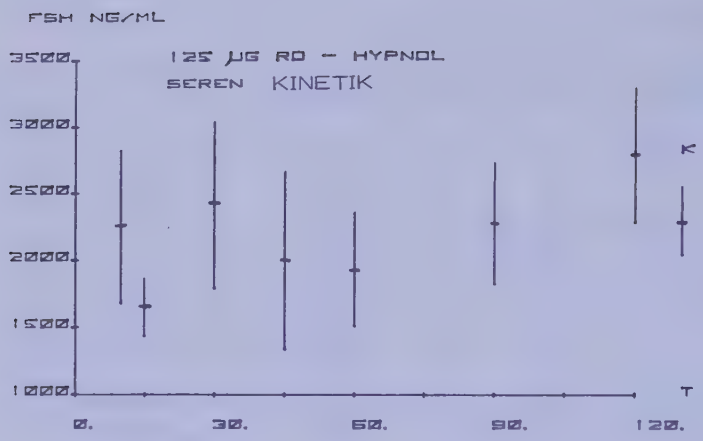


Abbildung 14:

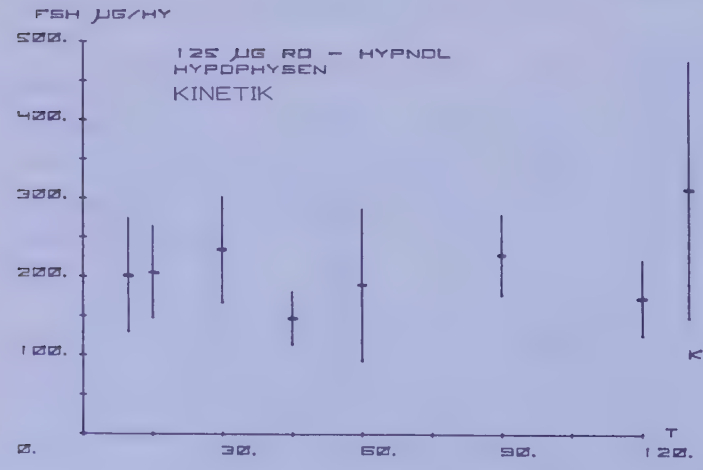


Abbildung 15:

Tabelle 16:
FSH-Biologische Tests, Kinetik bei 125 µg Flunitrazepam
Seren

Dosis in (10^{-6} g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	mg OG / 100 g TG	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys. NaCl	30	22	87,0	±	109,0	
0,375 E S - FSH	30	25	125,3	±	25,6	
0,075 E S - FSH	30	25	176,4	±	34,4	
125	10	5	102,5	±	23,6	-
125	15	5	116,4	±	22,7	-
125	30	5	101,5	±	23,6	-
125	45	5	108,1	±	10,7	+
125	60	5	114,5	±	20,4	-
125	90	5	117,1	±	4,8	-
125	120	5	115,3	±	17,3	+

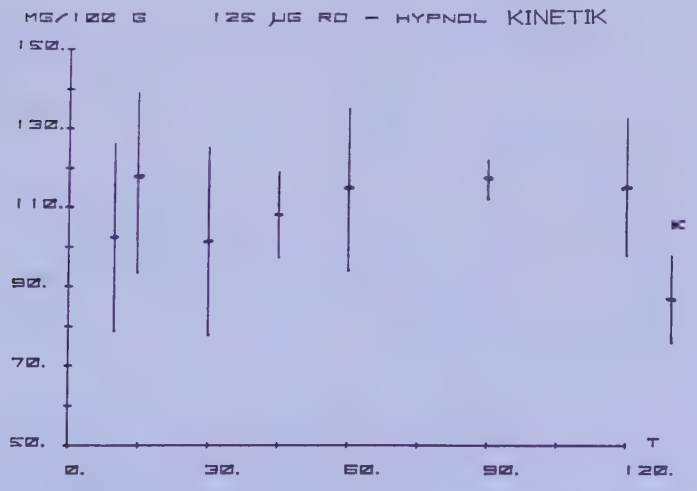


Abbildung 16:

Testgruppe 8: FSH-Test, Kinetik bei 62,5 µg Flunitrazepam

a) immunologische Auswertung

Die Tabellen 17 und 18 sowie die Abbildungen 17 und 18 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter, Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,0625 mg (= 62,5 µg) Flunitrazepam.

Die mittleren FSH-Serumwerte liegen mit Ausnahme eines einzigen unter dem Kontrollwert, die meisten sogar signifikant. Die mittleren FSH-Hypophysenkonzentrationen liegen alle unter der Kontrolle, wobei jedoch nur ein Wert signifikant vom Kontrollwert abweicht.

Aus Abbildung 17 geht hervor, daß die FSH-Serumkonzentrationen zwischen 10 und 90 Minuten post injectionem ansteigen, wobei sie jedoch größtenteils das Niveau der Kontrolle nicht erreichen, während der letzte Wert bei 120 Minuten p.i. die ansteigende Linie nicht fortsetzt sondern wieder abfällt.

Aus Abbildung 18 geht hervor, daß die FSH-Hypophysenkonzentrationen zwischen 10 und 45 Minuten p.i. abfallen, während der letzte Wert bei 90 Minuten p.i. die absteigende Linie nicht fortsetzt sondern zum Bereich des Kontrollwertes ansteigt.

Den größtenteils signifikant erniedrigten FSH-Serumkonzentrationen zwischen 10 und 90 Minuten p.i. stehen Hypophysenwerte gegenüber, welche zwar unterhalb der Kontrolle liegen, jedoch im Gegensatz zu den ansteigenden Serumkonzentrationen eine abfallende Tendenz erkennen lassen.

b) biologische Auswertung

Aus Abbildung 19 geht hervor, daß alle FSG-Serumkonzentrationen über dem Kontrollwert liegen, zum Teil sogar signifikant. Eine zeitliche Abhängigkeit ist nicht zu erkennen.

Tabelle 17:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 62,5 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	20	2292,3	±	249,7	
62,5	10	7	1572,8	±	204,4	+
62,5	15	7	1796,8	±	381,6	+
62,5	30	7	1894,6	±	379,1	+
62,5	45	7	1797,3	±	252,5	+
62,5	60	7	2007,1	±	411,3	-
62,5	90	6	2420,7	±	540,8	-
62,5	120	7	1721,4	±	321,3	+

Tabelle 18:

Hypophysen			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	20	312,0	±	162,6	
62,5	10	6	261,1	±	78,3	-
62,5	30	6	228,4	±	64,1	-
62,5	45	7	197,5	±	20,3	+
62,5	90	6	283,8	±	92,6	-

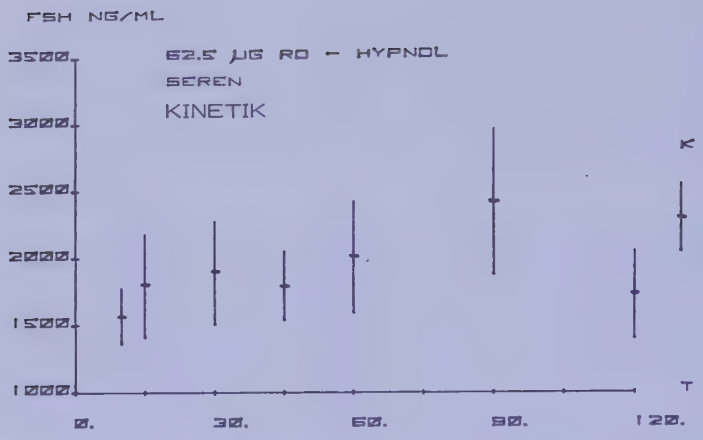


Abbildung 17:

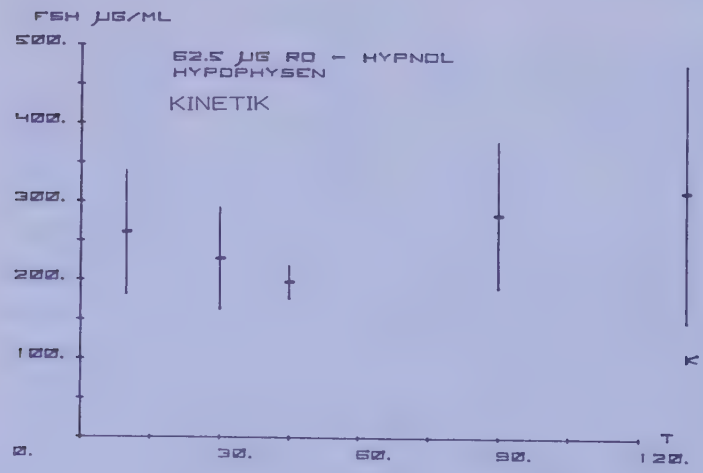


Abbildung 18:

Tabelle 19:

FSH-Biologische Tests, Kinetik bei 62,5 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6} g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	mg OG / 100 g TG	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys. NaCl	30	22	87,0	±	109,0	
0,375 E S - FSH	30	25	125,3	±	25,6	
0,075 E S - FSH	30	25	176,4	±	34,4	
62,5	10	5	112,2	±	17,9	+
62,5	15	5	119,1	±	15,7	+
62,5	30	5	118,6	±	27,3	-
62,5	45	5	127,7	±	10,5	+
62,5	60	5	100,0	±	8,6	-
62,5	90	5	126,2	±	39,0	-
62,5	120	5	121,8	±	15,6	+

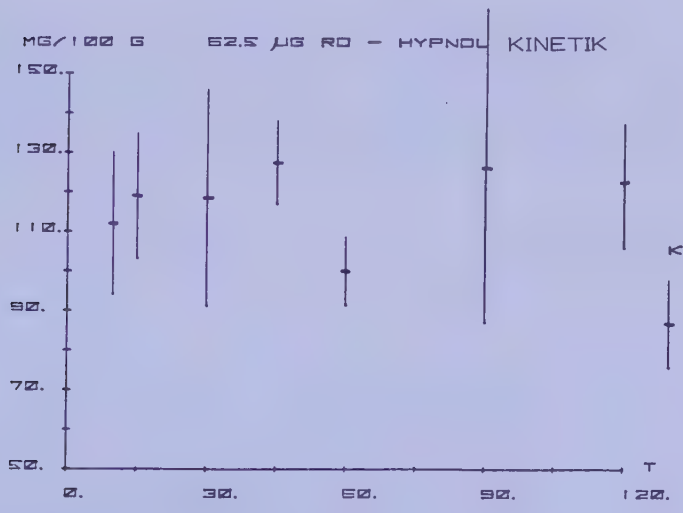


Abbildung 19:

Testgruppe 9: FSH-Test, Kinetik bei 31,25 µg Flunitrazepam

a) immunologische Auswertung

Die Tabellen 20 und 21 sowie die Abbildungen 20 und 21 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter, Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,03125 mg (= 31,25 µg) Flunitrazepam.

Die mittleren FSH-Serumkonzentrationen liegen alle unterhalb des Kontrollwertes, zum Teil signifikant. Auch die mittleren FSH-Hypophysenkonzentrationen liegen alle unterhalb der Kontrolle, jedoch in keinem Falle signifikant.

In Abbildung 20 läßt sich keine zeitliche Abhängigkeit der FSH-Serumkonzentrationen erkennen. Die Hypophysenwerte in Abbildung 21 zeigen im Großen und Ganzen eine leicht fallende Tendenz.

Den unter die Kontrolle erniedrigten Serumkonzentrationen stehen ebenfalls erniedrigte FSH-Hypophysenwerte gegenüber.

b) biologische Auswertung

Aus Abbildung 22 geht hervor, daß alle FSH-Serumkonzentrationen über dem Kontrollwert liegen, wobei jedoch nur 30 % eine Signifikanz aufweisen. Eine zeitliche Abhängigkeit ist nicht zu erkennen.

Tabelle 20:

FSH-Immunoassay, Kinetik bei 31,25 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	20	2292,3	±	249,7	
31,25	10	7	1852,4	±	566,7	-
31,25	15	7	2105,4	±	543,5	-
31,25	30	7	1900,3	±	397,7	+
31,25	45	7	1846,8	±	99,7	+
31,25	60	7	1935,6	±	304,3	+
31,25	90	7	1959,8	±	550,0	-
31,25	120	7	1975,2	±	320,9	-

Tabelle 21:

Hypophysen			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	20	312,0	±	162,6	
31,25	15	6	299,0	±	50,9	-
31,25	30	7	279,2	±	67,0	-
31,25	60	6	277,9	±	52,3	-
31,25	90	6	230,4	±	20,6	-
31,25	120	7	247,6	±	227,6	-

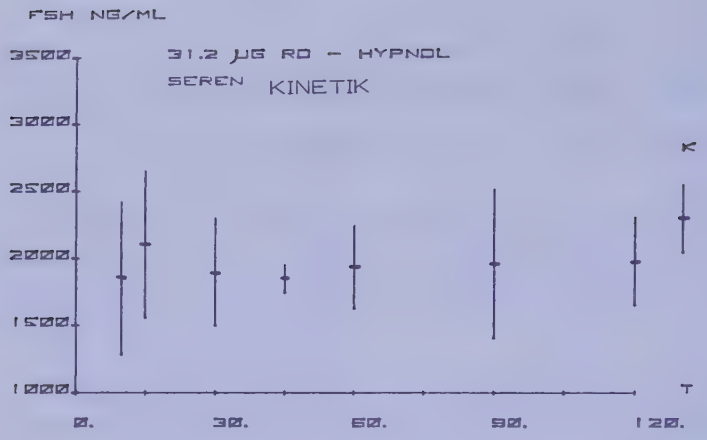


Abbildung 20:

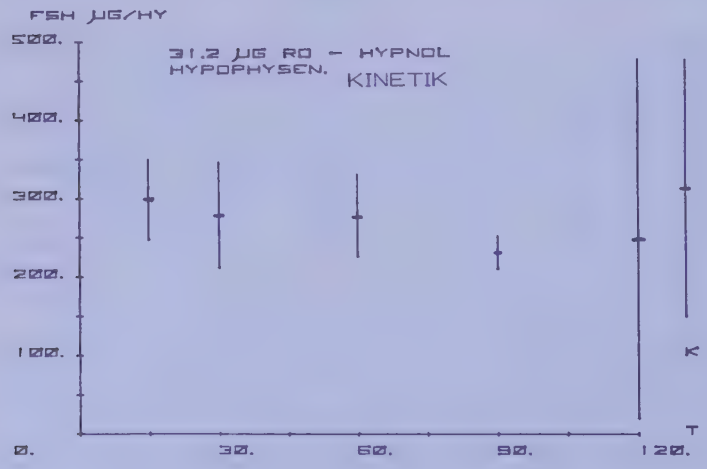


Abbildung 21:

Tabelle 22:

FSH-Biologische Tests, Kinetik bei 31,25 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	mg OG / 100 g TG	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	22	87,0	±	109,0	
0,375 E S - FSH	30	25	125,3	±	25,6	
0,075 E S - FSH	30	25	176,4	±	34,4	
31,25	10	5	106,9	±	10,7	+
31,25	15	5	100,8	±	12,3	-
31,25	30	5	102,5	±	14,7	-
31,25	60	5	99,5	±	15,0	-
31,25	90	5	114,8	±	14,3	+
31,25	120	5	97,8	±	9,5	-

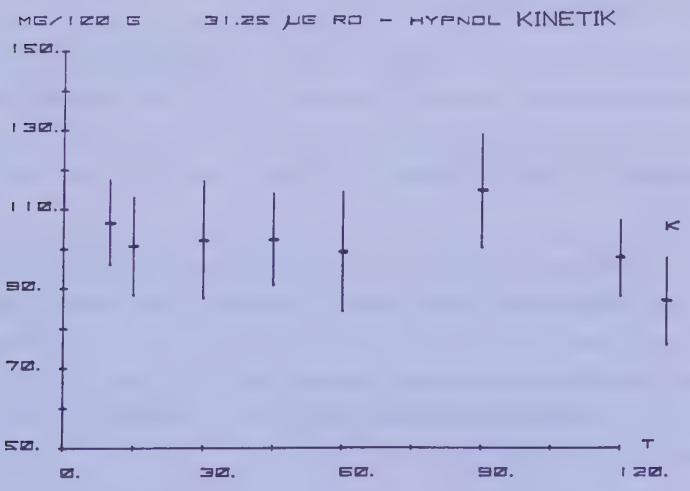


Abbildung 22:

Testgruppe 10: FSH-Test, Kinetik bei 15,625 µg Flunitrazepam

a) immunologische Auswertung

Die Tabellen 23 und 24 sowie die Abbildungen 23 und 24 zeigen die zeitliche Abhängigkeit der FSH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter, Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion von 0,015625 mg (= 15,625 µg) Flunitrazepam.

Die mittleren FSH-Serumkonzentrationen liegen größtenteils unterhalb des Kontrollwertes, wobei über 30 % der Werte signifikant von der Kontrolle abweichen.

Die mittleren FSH-Hypophysenkonzentrationen liegen meist unterhalb des Kontrollwertes.

Aus Abbildung 23 geht hervor, daß die FSH-Serumkonzentrationen zwischen 10 und 120 Minuten post injectionem um ein Niveau pendeln, das signifikant unterhalb der Kontrolle liegt, während sich die Werte zwischen 150 und 270 Minuten p.i. knapp, jedoch nicht signifikant unterhalb der Kontrolle bewegen.

In Abbildung 24 ist zu erkennen, daß die FSH-Hypophysenkonzentrationen zwischen 10 und 120 Minuten p.i. in einem Bereich unterhalb der Kontrolle liegen, wenn auch nicht signifikant. Die Werte zwischen 150 und 270 Minuten p.i. liegen signifikant über dem Kontrollwert.

Den signifikant erniedrigten FSH-Serumkonzentrationen zwischen 10 und 120 Minuten stehen ebenfalls signifikant erniedrigte Hypophysenwerte gegenüber. Den im Bereich der Kontrolle liegenden FSH-Serumkonzentrationen zwischen 150 und 270 Minuten p.i. entsprechen signifikant erhöhte Hypophysenkonzentrationen zwischen 150 und 270 Minuten.

b) biologische Auswertung

Aus Abbildung 25 geht hervor, daß die FSH-Serumkonzentrationen größtenteils signifikant über der Kontrolle liegen. Die Werte zeigen einen leichten Anstieg bis 60 Minuten p.i. und fallen dann wieder ab.

Tabelle 23:
FSH-Immunoassay, Kinetik bei 15,625 µg Flunitrazepam
Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	$\bar{x}$ (10^{-9}g/ml)	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	20	2292,3	±	249,7	
15,625	10	10	1914,2	±	573,4	-
15,625	15	9	1919,9	±	340,5	+
15,625	30	12	1781,6	±	394,6	+
15,625	45	9	1853,3	±	472,1	-
15,625	60	7	2185,3	±	649,3	-
15,625	90	11	1675,2	±	394,1	+
15,625	120	10	1745,0	±	313,0	+
15,625	150	10	2261,0	±	140,3	-
15,625	180	10	2327,7	±	267,5	-
15,625	210	11	2019,6	±	184,9	+
15,625	240	12	2404,3	±	298,4	-
15,625	270	8	2456,2	±	633,1	-

Tabelle 24:
Hypophysen

			$\bar{x}$ (10^{-6}g/Hy)			
phys.NaCl	30	20	312,0	±	162,6	
15,625	10	11	225,4	±	133,3	-
15,625	15	12	284,7	±	118,3	-
15,625	30	11	333,1	±	95,1	-
15,625	45	8	300,6	±	49,1	-
15,625	60	11	344,4	±	49,8	-
15,625	90	12	301,7	±	104,7	-
15,625	120	7	214,3	±	148,6	-
15,625	150	12	844,6	±	182,3	+
15,625	180	12	591,0	±	235,1	+
15,625	210	10	615,0	±	179,7	+
15,625	240	12	729,0	±	334,3	+
15,625	270	10	777,7	±	308,4	+

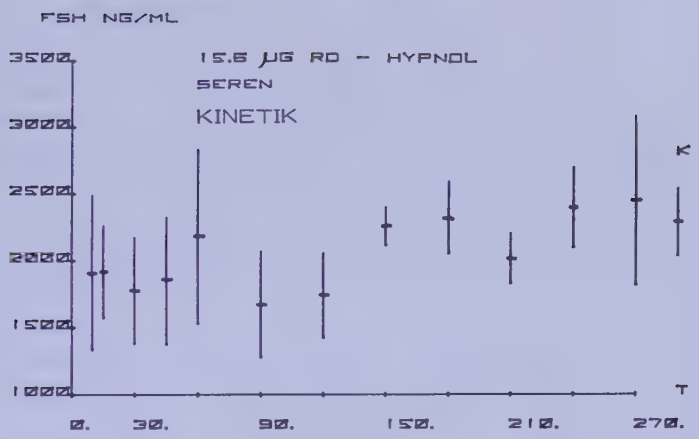


Abbildung 23:

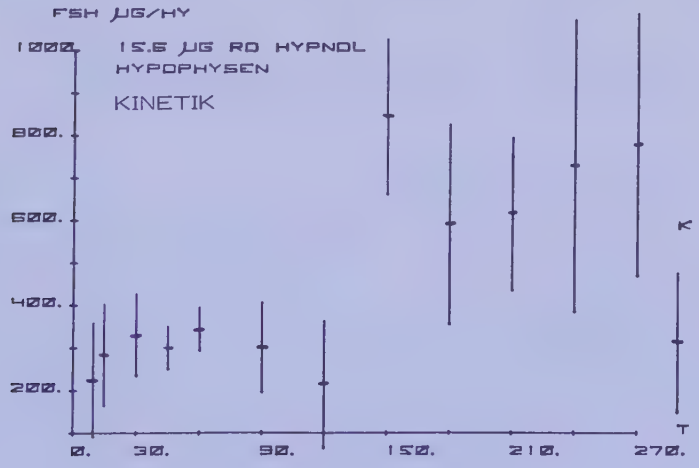


Abbildung 24:

Tabelle 25:

FSH-Biologische Tests, Kinetik bei 15,625 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	mg OG / 100 g TG	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	22	87,0	±	109,0	
0,375 E S - FSH	30	25	125,3	±	25,6	
0,075 E S - FSH	30	25	176,4	±	34,4	
15,625	10	5	116,2	±	29,8	+
15,625	15	5	108,1	±	21,1	-
15,625	30	4	114,4	±	13,3	+
15,625	45	5	123,7	±	20,6	+
15,625	60	5	123,6	±	10,6	+
15,625	90	5	116,0	±	12,0	+
15,625	120	5	109,1	±	23,2	-

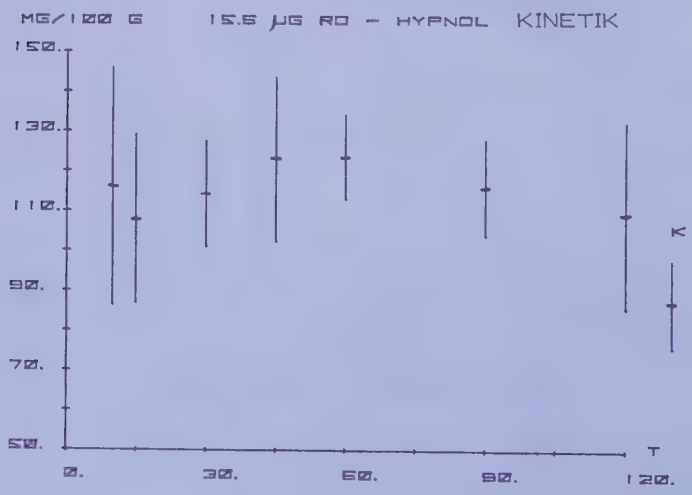
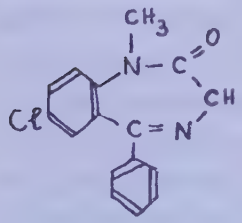


Abbildung 25:

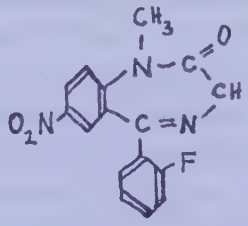
E DISKUSSION

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Substanzen auf ihre Wirkung in bezug auf die FSH- und LH-Freisetzung untersucht. Unter anderem überprüften SUPERSTINE und SULMAN (1966) die Wirkung von Diazepam auf die Gonadotropinausschüttung. Die Methode zur Feststellung des FSH- und LH-Release bestand damals in der Beobachtung vaginaler Parameter sowie in der histologischen Untersuchung der Keimdrüsen bei der Ratte. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß Diazepam die Gonadotropinausschüttung leicht, jedoch nicht signifikant, unterdrückt.

Flunitrazepam ist wie Diazepam ein Benzodiazepinderivat:



DIAZEPAM



FLUNITRAZEPAM

Auch hier stellt sich somit die Frage nach einer möglichen Beeinflussung des Gonadotropin-Release.

Aus diesem Grund wurde die zeitliche Abhängigkeit der FSH- und LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter, Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion verschiedener Dosen Flunitrazepam bei verschiedenen Testgruppen untersucht. Die LH-Serum- und Hypophysenwerte wurden jeweils mit dem Radioimmunoassay ermittelt, die FSH-Serumwerte sowohl mit dem Radioimmuno- als auch mit dem Bioassay und die FSH-Hypophysen wurden nur mit Hilfe des Radioimmunoassay ausgewertet.

Tabelle 25:

FSH-Biologische Tests, Kinetik bei 15,625 µg Flunitrazepam

Seren

Dosis in (10^{-6}g)	Zeit in (min)	Tier-zahl	mg OG / 100 g TG	±	$s_{\bar{x}}$	Sign. geg. Kontr.
phys.NaCl	30	22	87,0	±	109,0	
0,375 E S - FSH	30	25	125,3	±	25,6	
0,075 E S - FSH	30	25	176,4	±	34,4	
15,625	10	5	116,2	±	29,8	+
15,625	15	5	108,1	±	21,1	-
15,625	30	4	114,4	±	13,3	+
15,625	45	5	123,7	±	20,6	+
15,625	60	5	123,6	±	10,6	+
15,625	90	5	116,0	±	12,0	+
15,625	120	5	109,1	±	23,2	-

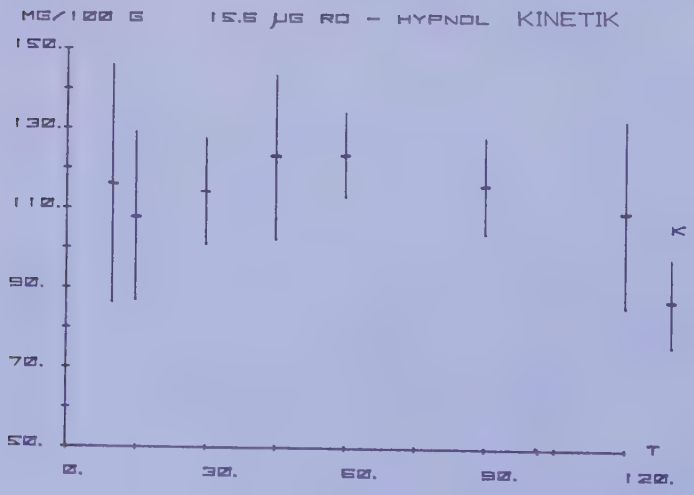
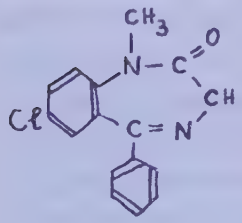


Abbildung 25:

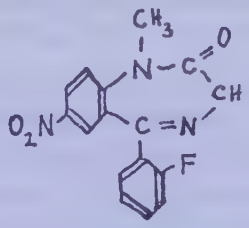
E DISKUSSION

In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Substanzen auf ihre Wirkung in bezug auf die FSH- und LH-Freisetzung untersucht. Unter anderem überprüften SUPERSTINE und SULMAN (1966) die Wirkung von Diazepam auf die Gonadotropinausschüttung. Die Methode zur Feststellung des FSH- und LH-Release bestand damals in der Beobachtung vaginaler Parameter sowie in der histologischen Untersuchung der Keimdrüsen bei der Ratte. Sie kamen zu dem Ergebnis, daß Diazepam die Gonadotropinausschüttung leicht, jedoch nicht signifikant, unterdrückt.

Flunitrazepam ist wie Diazepam ein Benzodiazepinderivat:



DIAZEPAM



FLUNITRAZEPAM

Auch hier stellt sich somit die Frage nach einer möglichen Beeinflussung des Gonadotropin-Release.

Aus diesem Grund wurde die zeitliche Abhängigkeit der FSH- und LH-Aktivität im Plasma und in den Hypophysen ovariektomierter, Östrogen-Progesteron-blockierter Wistar-Ratten nach intravenöser Injektion verschiedener Dosen Flunitrazepam bei verschiedenen Testgruppen untersucht. Die LH-Serum- und Hypophysenwerte wurden jeweils mit dem Radioimmunoassay ermittelt, die FSH-Serumwerte sowohl mit dem Radioimmuno- als auch mit dem Bioassay und die FSH-Hypophysen wurden nur mit Hilfe des Radioimmunoassay ausgewertet.

Die Ergebnisse der einzelnen Testgruppen wurden anschließend unter der folgenden Fragestellung betrachtet:

1. ob nach der Injektion von Flunitrazepam FSH und LH freigesetzt werden
2. wenn ja, ob eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der injizierten Menge Flunitrazepam und den freigesetzten LH- bzw. FSH-Aktivitäten besteht,
3. wie sich nach Injektion einer bestimmten Menge Flunitrazepam in Abhängigkeit von der Zeit die LH- bzw. die FSH-Aktivitäten im Plasman und in den Hypophyse ändern.

Die Fragen 1 und 3 lassen sich für jede Dosis zunächst einzeln beantworten:
Nach Injektion von 250 µg Flunitrazepam liegen die mittleren LH-Serumwerte meist unter, die mittleren LH-Hypophysenwerte meist über der Kontrolle. Da die LH-Serumkonzentrationen zum größten Teil und die LH-Hypophysenkonzentrationen in beinahe 50 % der Fälle signifikante Abweichungen von der Kontrolle darstellen, kann man hier auf eine verminderte LH-Freisetzung aus der Hypophyse schließen. Eine deutliche Zeitabhängigkeit war weder im Serum noch bei den Hypophysen zu erkennen.

Der FSH-Immunoassay ergab nach Injektion von 250 µg der Testsubstanz sowohl im Serum als auch in den Hypophysen eine in etwa der Hälfte der Fälle signifikante FSH-Erhöhung. Eine deutliche Zeitabhängigkeit war weder im Serum noch in den Hypophysen zu erkennen.

Der FSH-Bioassay nach Injektion von 250 µg Flunitrazepam ergab eine generelle Erhöhung des Serum-FSH, jedoch fand sich nur in weniger als 30 % der Fälle eine Signifikanz. Eine zeitliche Abhängigkeit war auch hier nicht zu erkennen.

Nach Injektion von 125 µg Flunitrazepam liegen im Radioimmunoassay die mittleren LH-Serumwerte wie bei der Gabe von 250 µg mehrheitlich unter, die mittleren LH-Hypophysenkonzentrationen sogar alle

über der Kontrolle. Dies bedeutet, daß die LH-Inkretion ins Serum gehemmt wurde, während sich das LH in den Hypophysen gleichzeitig anstaute. Allerdings sind nur wenige Werte signifikant und es läßt sich keine zeitliche Abhängigkeit erkennen.

Im FSH-Immunoassay liegen ganz im Gegensatz zu den Ergebnissen bei 250 µg die Serum- als auch die Hypophysenwerte größtenteils unterhalb der Kontrolle.

Auch im FSH-Immunoassay nach Injektion von 125 µg der Testsubstanz lassen weder die Serum- noch die Hypophysenkonzentrationen eine zeitliche Abhängigkeit erkennen.

Der FSH-Bioassay nach Gabe von 125 µg Flunitrazepam zeigte eine generelle Erhöhung des Serum-FSH, was einen Gegensatz zur Aussage des Immunoassay darstellt. Eine zeitliche Abhängigkeit war auch hier nicht zu erkennen.

Nach Injektion von 62,5 µg Flunitrazepam wurde wie bei den beiden vorhergehenden Dosen eine leichte Erniedrigung der LH-Serumwerte und eine leichte Erhöhung der LH-Hypophysenkonzentrationen festgestellt, jedoch zeigte sich in keinem Fall ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Eine zeitliche Abhängigkeit ist nicht festzustellen.

Wie nach Injektion von 125 µg liegen auch hier die FSH-Serum- und Hypophysenkonzentrationen des Immunoassay größtenteils unterhalb der Kontrollwerte, die Serumwerte meist signifikant, die Hypophysenwerte nicht signifikant.

Wie in allen vorhergehenden Beispielen liegen auch hier die FSH-Serumwerte des Bioassay im Gegensatz zur Aussage des Radioimmunoassay oberhalb der Kontrolle. Eine zeitliche Abhängigkeit läßt sich nicht erkennen.

Nach Injektion von 31,25 µg Flunitrazepam liegen alle mittleren LH-Serumwerte unter dem Kontrollwert, die LH-Hypophysenkonzentrationen darüber. Bei den Serum- und bei den Hypophysenwerten ergab sich diesmal sogar in über 50 % eine Signifikanz. Eine Zeitabhängigkeit ließ sich nicht feststellen.

Im FSH-Immunoassay befanden sich ähnlich wie schon bei Gabe von 125 µg und 62,5 µg Flunitrazepam die mittleren FSH-Serum- und Hypophysenkonzentrationen alle unterhalb der Kontrolle, doch erscheinen hier wenig signifikante Werte und es ist keine zeitliche Abhängigkeit zu erkennen.

Der FSH-Bioassay nach Injektion von 31,25 µg Flunitrazepam ergab eine generelle Erhöhung des Serum-FSH bei einer Signifikanz der Werte in einem Drittel der Fälle. Die Ergebnisse ließen sich zeitlich nicht einordnen.

Nach Injektion von 15,625 µg Flunitrazepam ergab sich eine Erniedrigung der mittleren LH-Serumkonzentrationen, die in mehr als 50 % signifikant war, während sich die LH-Hypophysenwerte alle oberhalb der Kontrolle bewegen. Eine zeitliche Abhängigkeit ist weder bei den Serum- noch bei den Hypophysenwerten zu sehen.

Im FSH-Immunoassay liegen auch in diesem Fall die mittleren FSH-Serumkonzentrationen größtenteils unterhalb des Kontrollwertes, die mittleren FSH-Hypophysenkonzentrationen meist darüber.

Der FSH-Bioassay nach Gabe von 15,625 µg Flunitrazepam ergab eine signifikante Erhöhung fast aller Werte gegenüber der Kontrolle. Die Werte zeigen einen leichten Anstieg bis 60 min. p.i. und fallen dann wieder ab.

Was bleibt ist die Frage (2), ob eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der injizierten Menge von Flunitrazepam und den freigesetzten LH- bzw. FSH-Aktivitäten besteht.

Beim Vergleich von verschiedenen Serum- und Hypophysen-LH-Konzentrationen aus den verschiedenen Kinetiken, wobei die Zeitspanne post injectionem dieselbe, die verabreichte Dosis von Flunitrazepam entweder 250 µg, 125 µg, 62,5 µg, 31,25 µg oder 15,625 µg war, ließ sich keine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen.

Das heißt, daß die LH-Ausschüttung ins Serum durch alle verwendeten Dosen Flunitrazepam gehemmt wird und keiner zeitlichen Abhängigkeit unterliegt.

Der FSH-Immunoassay zeigt bei der Anwendung mittlerer Dosen Flunitrazepam (31,25 µg, 62,5 µg und 125 µg), daß sowohl die FSH-Serum- als auch die Hypophysenkonzentrationen mehrheitlich unterhalb der Kontrolle liegen.

Nach Gabe von 250 µg dagegen ergibt sich sowohl im Serum als auch in den Hypophysen eine Erhöhung des FSH-Gehaltes. Auch bei Injektion von 15,625 µg steigen, wenn auch erst zwischen 150 und 270 min post injectionem, die FSH-Hypophysen- und Serumwerte an.

Der FSH-Bioassay, der auf der Ovargewichtszunahme nach Injektion des zu untersuchenden Serums beruht, ergab in jedem Fall eine Erhöhung des Serum-FSH, was mit den Ergebnissen des Radioimmunoassay nicht zu vereinbaren ist. Er wird deshalb in diesem Zusammenhang als qualitative und nicht als quantitative Aussage gewertet.

Während SUPERSTINE und SULMAN (1966) die Aussage machten, Diazepam unterdrücke die Gonadotropininkretion nur insignifikant, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, daß die Inkretion von LH durch Flunitrazepam in den meisten Fällen gehemmt wird, oft sogar signifikant, während die Ausschüttung von FSH im mittleren Dosisbereich vermindert, im hohen und tiefem Dosisbereich dagegen erhöht ist.

Auch STOCK, K.D. (1978) fand mit dem Radioimmunoassay eine teilweise signifikante Abnahme der LH-Serumkonzentration unter Diazepamverabreichung, während in bezug auf die FSH-Inkretion keine signifikante Wirkung hervorgerufen wurde.

Der Vergleich der vorliegenden Arbeit mit den Untersuchungen von SUPERSTINE und SULMAN (1966) und STOCK, K.D. (1978) ist deshalb möglich, weil sowohl in den genannten Arbeiten als auch in der vorliegenden annähernd gleiche Dosen der Testsubstanz verwendet wurden (STOCK, K.D., 1978).

Das Benzodiazepinderivat Flunitrazepam wirkt auf die Ausschüttung von FSH und LH im gleichen Sinn und in gleicher Intensität wie Dia-

zepam, obwohl es sich in der Molekülstruktur von ihm unterscheidet.

Die Annahme einer Wirkung von Flunitrazepam auf die Ausschüttung der Gonadotropine FSH und LH aus dem Hypophysenvorderlappen der Ratte wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt.

F ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von Flunitrazepam auf die Freisetzung von FSH und LH aus dem Hypophysenvorderlappen untersucht.

Die Releasingaktivität wurde mittels der Methode von RAMIREZ und McCANN (1963) nachgewiesen. Flunitrazepam und Äthylalkohol wurden zu gleichen Teilen miteinander versetzt, mit physiologischer NaCl verdünnt und den mit Östrogen-Progesteron blockierten weiblichen Wistar-Ratten unter Zusatz von Heparin intravenös injiziert. Der LH-Gehalt des Serums und der Hypophysen wurde radioimmunologisch nach der Doppelantikörpermethode bestimmt. Dasselbe Verfahren wurde auch bei den FSH-Serum- und Hypophysenkonzentrationen angewandt. Die Bestimmung des Serum-FSH-Gehaltes erfolgte zusätzlich nach der biologischen Methode von STEELMAN und POHLEY (1953).

Alle verwendeten Dosen von Flunitrazepam führten zu einer Hemmung der LH-Ausschüttung in das Serum und zu einer Erhöhung des hypophysären LH-Gehaltes. Bei Gabe von 250 µg, 31,25 µg und 15,625 µg Flunitrazepam war die LH-Serumkonzentration in mehr als 50 % der Fälle signifikant erniedrigt. In den mittleren Dosisbereichen zeigten sich ebenfalls erniedrigte LH-Serumkonzentrationen, jedoch ohne Signifikanz gegenüber der Kontrolle. Eine zeitliche Abhängigkeit ist in diesem Zusammenhang nicht zu erkennen.

Der FSH-Immunoassay zeigt bei der Anwendung mittlerer Dosen Flunitrazepam (31,25 µg, 62,5 µg und 125 µg), daß sowohl die FSH-Serum- als auch die Hypophysenkonzentrationen mehrheitlich unterhalb der Kontrolle liegen.
Eine zeitliche Abhängigkeit ist nicht zu erkennen.

G LITERATURVERZEICHNIS

1. AKERT, K.:
Das limbische System und seine funktionelle Bedeutung.
Fortschr. Geburtsh. Gynäk. 19, 4-17 (1964)

2. BARRACLOUGH, C.E.:
Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepubertal rats to steroid hormones.
Rec. Prog. in Hor. Res. 22, 503-539 (1966)

3. BARRACLOUGH, C.A. and GORSKI, R.A.:
Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat.
Endocrinology 68, 68-79 (1961)

4. BINDONI, M. and RAFFAELE, R.:
Mitotic activity in the adenohypophysis of rats after pinealectomy.
J. Endocr. 41, 451-452 (1968)

5. BLOBEL, R. und SCHLUMBERGER, H.D.:
Über die zentrale Steuerung der weiblichen Gonadenfunktion.
Med. Welt 51, 3132-3141 (1967)

6. CHOWERS, J. and McCANN, S.M.:
Content of luteinizing hormone-releasing factor and luteinizing hormone during the estrous cycle and after changes in gonadal steroid titers.
Endocrinology 76, 700-708 (1965)

7. COPER, H.:
Psychopharmaka, Pharmakotherapie von Psychosen und psychoreaktiven Störungen.
In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, herausgegeben von W. FORTH, HENSCHLER, D. und RUMMEL, W.,
Bibliographisches Institut AG Zürich, pp. 433-450 (1975)

8. CORBIN, A.:
Pituitary and plasma LH of ovariectomized rats with median eminence implants of LH.
Endocrinology 78, 893-896 (1966)

9. CORBIN, A. and COHEN, A.I.:
Effect of median eminence implants of LH on pituitary LH of female rats.
Endocrinology 78, 41-46 (1966)

10. CRAMER, O.H. and PORTER, J.C.:
In: Drug effects on Neuroendocrine Regulation.
Elsevier, New York, Vol. 39, 73-85 (1973)

11. DAVID, M.A., FRASCHINI, F. and MARTINI, L.:
Control of LH secretion: role of a 'short' feedback mechanism.
Endocrinology 78, 55-60 (1966)

12. DESCLIN, L., FLAMENT-DURAND, J. and GEPTS, W.:
Transplantation of the ovary to the spleen in rats with persistent estrus resulting from hypothalamic lesions.
Endocrinology 70, 429-436 (1962)

13. DHARIWAL, A.P.S., ANTUNES-RODRIGUES, J. and McCANN, S.M.:
Purification of ovine luteinizing hormone releasing factor by gel filtration and ion exchange chromatography.
Proc. Soc. Exp. Biol. med. 118, 999-1003 (1965)

14. DÖCKE, F. and DÖRNER, G.:
The mechanism of the induction of ovulation by oestrogens.
J. Endocrin. 33, 491-499 (1965)

15. DONOSO, A.O. and DE GUTIERREZ MOYANO, M.B.:
Adrenergic activity in hypothalamus and ovulation.
Proc. Soc. Exp. Biol. med. 135, 633-635 (1970)

16. DORFMAN, R.J. and DORFMAN, A.S.:
Pituitary gonadotropic inhibitory action of estrone in parabiotic rats.
Endocrinology 72, 115-116 (1963)

17. ELEFTHERIOU, B.E., DESJARDINS, C. and ZOLOVICK, A.J.:
Effects of amygdaloid lesions on hypothalamic hypophysical luteinizing hormone activity.
J. Reprod. Fertil. 21, 249-254 (1970)

18. ELWERS, M. and CRITCHLOW, V.:
Precocious ovarian stimulation following hypothalamic and amygdaloid lesions in rats.
Amer. J. Physiol. 198, 381-385 (1960)

19. EVERETT, J.W.:
Ovulation in rats from preoptic stimulation through platinum electrodes. Importance of duration and spread of stimulus.
Endocrinology 76, 1195-1201 (1965)

20. EVERETT, J.W. and QUINN, D.L.:
Differential hypothalamic mechanism inciting ovulation and pseudopregnancy in the rat.
Endocrinology 78, 141-150 (1966)

21. FAWCETT, C.P., REED, M., CHARLTON, H.M. and HARRIS, G.W.:
The purification of luteinizing hormone-releasing factor with some observations on its properties.
Biochem. J. 106, 229-236 (1968)

22. FLAMENT-DURAND, J. and DESCLIN, L.:
Observations concerning the hypothalamic control of pituitary lutetrophin secretion in the rat.
Endocrinology 75, 22-26 (1964)

23. FLERKO, B.:
Einfluß experimenteller Hypothalamusläsion auf die durch Follikelhormon indirekt hervorgerufene Hemmung der Luteinisation.
Endokrinologie 34, 202-208 (1957)

24. FLERKO, B. and BARDOS, V.:
Absence of compensatory ovarian hypertrophy in rats with anterior hypothalamic lesions.
Acta. endocrin., Kbh. 36, 180-184 (1961)

25. FRASCHINI, F., MESS, B. and MARTINI, L.:
Pineal gland, melatonin and the control of luteinizing hormone secretion.
Endocrinology 82, 919-924 (1968b)

26. FRASCHINI, F., MOTTA, M. and MARTINI, L.:
A short feedback mechanism controlling FSH secretion.
Experientia 24, 270-271 (1968a)

27. FUXE, K. and HÖKFELT, T.:
Catecholamines in the hypothalamus and the pituitary gland.
Frontiers in Neuroendocrinology, Oxford University Press 289, 47-96 (1969)

28. GREEN, J.D. and HARRIS, G.W.:
The neurovascular link between the neurophypophysis and the adenohypophysis.
J. Endocr. 5, 136-146 (1947)

29. GLOOR, P.:
Telencephalic influences upon the hypothalamus.
In: Hypothalamic-hypophysial interrelationships.
pp. 74-113. Eds FIELD, W.S., GUILLEMIN, R. and CARTON, C.A., Springfield, III.: Charles C. Thomas (1956)

30. GROOM, G.V. and BOYNS, A.R.:
Effect of hypothalamic releasing factors by organ and steroids on release of gonadotrophins by organ cultures of human foetal pituitaries.
J. Endocrinol. 59, 511-522 (1973)

31. GROOM, G.V. and COOKE, I.D. and BOYNS, A.R.:
Differential release of individual gonadotrophins by the human foetal pituitary gland after simulation by cyclic AMP and sodium flucride.
J. Endocrinol., 50, 709-710 (1971)

32. HALASZ, B.:
The endocrine effects of isolation of the hypothalamus from the rest of the brain.
Frontiers in Neuroendocrinology 289, 307-342 (1969)

33. HARRIS, G.W.:
Hypothalamic control of the anterior pituitary gland.
Ciba found. Coll. Endocrinology, Vol. 4 p. 106 (1952)

34. HEINER, L. und NAUTA, W.J.H.:
The hypothalamic distribution of the stria terminalis in the rat.
Brain research 13, 284-297 (1969)

35. HELLER, S. and SCHLUMBERGER, H.D.:
Comparison of the gonadotropin-release induced by a hypothalamic factor and by a synthetic decapeptide exhibiting LH-releasing activity.
Gynec. Invest. 2, 122-127 (1971)

36. HELLER, S.:
Nachweis und biologische Charakterisierung von menschlichen Gonadotropin-Releasing-Aktivitäten.
Fortschr. Geb. Gynäk. 46, 146-214 (1972)

37. HIROI, M., SUGITA, S. and SUZUKI, M.:
Ovulation induced by implantation of cupric sulfate into the brain of the rabbit.
Endocrinology 77, 963-967 (1965)

38. HOHLWEG, H. und JUNKMANN, K.:
Die hormonal-nervöse Regulierung der Funktion des Hypophysenvorderlappens.
Klin. Wschr. 11, 321-323 (1932)

39. IGARASHI, M., NALLAR, R. and McCANN, S.M.:
Further studies on the follicle-stimulating hormone-releasing action of hypothalamic extracts.
Endocrinology 75, 901-907 (1964)

40. JUSTISZ, M., PALOMA DE LA LLOSA, M.:
L-adenosine-3-5-monophosphate cyclique, un intermediaire probable de l'action de l'hormone hypothalamique FRF.
C.R.Acad. sci. (D) 268, 19 1636-1639 (1969)

41. KALRA, P.S., KALRA, S.P., KRULICH, L., FAWCETT, C.P. and McCANN, S.M.:
Involvement of norepinephrine in transmission of the stimulatory influence of progesterone on gonadotropin release.
Endocrinology 90, 1168-1176 (1972)

42. KALRA, P.S. and McCANN, S.M.:
Involvement of catecholamines in feedback mechanisms.
Progress in Brain Research. 39, 185-198 (1973)

43. KALRA, S.P. and McCANN, S.M.:
Effect of drugs modifying catecholamine synthesis on LH release induced by preoptic stimulation in the rat.
Endocrinology 93, 356-362 (1973)

44. KAMBERI, I.A., MICAL, R.S. and PORTER, I.C.:
Luteinizing hormone releasing activity in hypophysial stalk blood and elevation by dopamine.
Science 166, 388-390 (1969)

45. KAMBERI, I.A., MICAL, R.S. and PORTER, J.C.:
Intraventricular (V_3) injection or pituitary perfusion of catecholamines and prolactin (LTH) release.
Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 29, 378 (1970)

46. KAMBERI, I.A., MICAL, R.S. and PORTER, J.C.:
Effect of anterior pituitary perfusion and intraventricular injection of catecholamines on FSH release.
Endocrinology 88, 1003-1011 (1971)

47. KAMBERI, I.A., SCHNEIDER, H.P.G. and McCANN, S.M.:
Action of dopamine to induce release of FSH-releasing-factor (FRF) from hypothalamic tissue in vitro.
Endocrinology 86, 278-284 (1970)

48. KANEMATSU, S. and SAWYER, C.H.:
Effects of hypothalamic and hypophyseal estrogen implants on pituitary and plasma LH in ovariectomized rabbits.
Endocrinology 75, 579-585 (1964)

49. KATO, J. and VILLEE, C.A.:
Factor affecting uptake of estradiol-6,7-^{3}BE by the hypophysis and hypothalamus.
Endocrinology 80, 1133-1138 (1967)

50. MAC LEOD, R.M.:
Influence of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone.
Endocrinology 85, 916-923 (1969)

51. MAHNERT, A.:
Hypophysenvorderlappen und Ovarium. Tierexperimentelle Untersuchungen über das Bestehen wechselseitiger Beziehungen zwischen Ovarium und dem Hypophysenvorderlappen.
Zbl. Gynäk. 52, 1754 (1928)

52. MALVEN, P.V.:
Electrical stimulation of the median eminence in ovariectomized and estradiol-treated sheep. Increased LH-release and evidence for neural regulation in of spontaneous LH rhythms.
Neuroendocrinology 19, 81-90 (1975)

53. MARTINI, L., FRASCHINI, F. and MOTTA, M.:
Neural control of anterior pituitary functions.
Recent Progr. Hormone Res. 24, 439-496 (1968)

54. MARTINI, L., FRASCHINI, F. and MOTTA, M.:
Hypothalamic mechanism and anterior pituitary functions; Advances in the biosciences. 1. Schering Symp. Endocrinology, Berlin 1967, p. 201 (Pergamon Press, London 1969)

55. McCANN, S.M.:
A hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor. Amer. J. Physiol. 202, 395-400 (1962)

56. McCANN, S.M., OJEDA, S.R., FAWCETT, C.P., KRULICH, L.:
Catecholaminergic control of gonadotropin and prolactin secretion with particular reference to the possible participation of dopamine.
Adv. Neurol. 5, 435-445 (1974)

57. McCANN, S.M. and RAMIREZ, V.D.:
The neuroendocrine regulation of hypophyseal luteinizing hormone secretion.
Recent Progr. Hormone Res. 20, 131-181 (1964)

58. MICHAEL, R.P.:
Estrogen sensitive neurons and sexual behaviour in female cats.
Science 136, 322-323 (1962)

59. NAUTA, W.J.H.:
An experimental study of the fornix system of the rat.
J. comp. Neurol. 104, 247-273 (1956)

60. NIKITOWITCH-WINER, M.B. and Everett, J.W.:
Comparative study of luteotropin secretion by hypophyseal autotransplantants in the rat. Effects of site and stages of the estrus cycle.
Endocrinology 62, 522-532 (1958)

61. OJEDA, S.R., KRULICH, L. and McCANN, S.M.:
Evidence for participation of a catecholaminergic mechanism in the post-castration rise in plasma gonadotropins.
Neuroendocrinology 12, 295-315 (1973)

62. PAESI, F.J.A. and REES, G.P. VAN:
The effect of gonadectomy on the response of the pituitary ICSH-content to steroid sex hormones.
Acta endocrin. Kbh. 35, 235-244 (1960)

63. PARLOW, A.F.:
Importance of differential quantitative bioassay for pituitary gonadotrophins in the rat.
Endocrinology 75, 138-139 (1964)

64. PASCHKIS, K.E. and RAKAFF, A.E.:
Some aspects of the physiology of estrogenic hormones.
Recent Progr. Hormone Res. 5, 115-149 (1950)

65. PAVEL, S. and PETRESCU, S.:
Inhibition of gonadotrophin by a highly purified pineal peptide and by synthetic arginine vasotocin.
Nature, Lond. 212, 1054 P (1966)

66. POPA, G.T. and FIELDING, U.:
A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region.
J. of Anat. 65, 88 (1931)

67. PÖLDINGER, W.:
Kompendium der Psychopharmakatherapie.
Deutsche Hoffmann-La-Roche A.G. Grenzach (1967)

68. RAISMAN, G., COWAN, W.M. and POWELL, T.P.S.:
An experimental analysis of the efferent projection of the hippocampus.
Brain, 89, 83-108 (1966)

69. RAMIREZ, V.D., NALLAR, R. and McCANN, S.M.:
Purification of luteinizing hormone-releasing factor from beef hypothalamus.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 115, 1072-1076 (1964a)

70. RAMIREZ, V.D. and McCANN, S.M.:
A highly sensitive test for LH-releasing activity: the ovariectomized, estrogen-progesteron-blocked rat.
Endocrinology 73, 193-198 (1963a)

71. ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. and SUTHERLAND, G.W.:
Cyclic AMP.
A. Rev. Biochem. 37, 149-174 (1968)

72. SAWYER, C.H., EVERETT, J.W. and MARKEE, J.E.:
A neutral factor in the mechanism by which estrogen induces the release of luteinizing hormone in the rat.
Endocrinology 44, 218 (1949)

73. SCHALLY, A.V., SAITO, T., ARIMURA, A., MÜLLER, E.E., BOWERS, C.Y. and WHITE, W.F.:
Purification of follicle-stimulating hormone-releasing factor (FSH-RF) from bovine hypothalamus.
Endocrinology 79, 1078 (1966)

74. SCHALLY, A.V., ARIMURA, A., KASTIN, A.j., MATSUO, H., BABA, Y., REDDING, T.W., NAIR, R.M.G. and DEBELJUK, L.y:
Gonadotrophin-releasing-hormone: One polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones.
Science, N.Y. 173, 1036-1037 (1971a)

75. SCHALLY, A.V., BABA, Y., REDDING, T.W., MATSUO, H. and ARIMURA, A.:
Further studies on the enzymatic and chemical inactivation of hypothalamic FSH-RH.
Neuroendocrinology 8, 347-358 (1971)

76. SCHALLY, A.V., NAIR, R.M.G., REDDING, T.W. and ARIMURA, A.:
Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone releasing hormone from porcine hypothalami.
J. biol. Chem. 246, 7230-7236 (1971 b)

77. SCHALLY, A.V., REDDING, T.W., MATSUO, H. and ARIMURA, A.:
Stimulation of FSH- and LH-release in vitro by natural and synthetic LH and FSH releasing hormone.
Endocrinology 90, 1561-1568 (1972)

78. SCHNEIDER, H.P.G. and McCANN, S.M.:
Mono- and indolamines and control of LH secretion.
Endocrinology 86, 1127 (1970)

79. SCHNEIDER, H.P.G. and McCANN, S.M.:
Release of LH-releasing factor (LRF) into the peripheral circulation of hypophysectomized rats by dopamine and its blockade by estradiol.
Endocrinology 78, 249-253 (1970)

80. SOFFER, L.J., FOGEL, M. and RUDAVSKY, A.Z.:
The presence of a gonadotrophin-inhibiting substance in pineal gland extracts.
Acta endocrin., Kbh. 48, 561-564 (1965)

81. STEELMAN, S.L. and POHLEY, F.M.:
Assay of the follicle-stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin.
Endocrinology 53, 604-616 (1953)

82. STOCK, K.D.:
Untersuchungen über die Wirkung eines Benzodiazepin-derivates Diazepam auf die Freisetzung von Follikel stimulierendem und luteinisierendem Hormon aus der Hypophyse.
Inaugural-Dissertation, Universität Tübingen, 1978

83. SUPERSTINE, E. und SULMAN, F.G.:
The mechanism of the push and pull principle/VII Endocrine effects of chlordiazepoxide, diazepam and guanethidine.
Arch. int. Pharmacodyn. 160, No 1, 133-146 (1966)

84. SZENTAGOTHAI, J., FLERKO, B., MESS, B., HALASZ, B.:
Hypothalamic control of the anterior pituitary.
(Akademiai Kiadó, Budapest 1968)

85. TANG, L.K. and SPIES, H.G.:
Effect of synthetic LH-releasing factor (LRF) on LH-secretion in monolayer cultures of the anterior pituitary cells of cynomologus monkeys.
Endocrinology 25, 1016-1021 (1974)

86. TAUBERT, A.D.:
Gynäkologische Endokrinologie
in: Schmidt-Matthiesen: Gynäkologie und Geburtshilfe, 2. Auflage, Stuttgart-New York: Schattauer 1975

87. VELASCO, M.E., TALEISNIK, S.:
Effects of the interruption of amygdaloid and hippocampal afferents to the medial hypothalamus on gonadotrophin release.
J. endocrinol. 51, 41-55 (1971)

88. WAKABAYASHI, K., ANTUNES-RODRIGUES, J., TAMAOKI, B.I. and McCANN, S.M.:
In vitro effect of hypothalamic extract and other stimulating agents on glucose oxidation and luteinizing hormone release from rat anterior pituitary glands.
Endocrinology 90, 690-699 (1972)

89. WATSON, J.T., KRULICH, L. and McCANN, S.M.:
Effect of crude rat hypothalamic extract on serum gonadotropin and prolactin levels in normal and orchidectomized male rats.
Endocrinology 89, 1412-1418 (1971)

90. WESTMAN, A. und JACOBSOHN, D.:
Endokrinologische Untersuchungen an Ratten mit durchtrenntem Hypophysenstiel.
3. Mitteilung: Über die luteinisierende Wirkung des Follikelhormons.
Acta Obstetr. Scand. (Schwd.) 18, 115 (1938)

91. WHITE, W.F.:
Hypophysiotropic Hormones of the Hypothalamus.
Meites, J. Ed. Williams und Wilkins (Baltimore)
p. 248 (1970)

92. WURTMAN, R.J., ROTH, W., ALTSCHULE, M.D. and WURTMAN, J.:
Interaction of the pineal and exposure to continuous light on organ weights of female rats.
Acta endocrin., Kbh. 36, 617-624 (1961)

93. ZOR, U., KANEKO, T., SCHNEIDER, H.P., McCANN, S.M. and FIELD, J.B.:
Further studies of stimulation of anterior pituitary cyclic Adenosine 3', 5'-monophosphate formation by hypothalamic extract and prostaglandines.
J. Biol. Chem. 245, 2883-2888 (1970)

LEBENSLAUF

Am 2. Mai 1952 wurde ich, Anna Josefa S t o c k, geb. Nafz, als Tochter des Dr. med. Alban Nafz und der Dr. med. Agnes Nafz, geb. Almodt, in Osterburken, Neckar-Odenwald-Kreis, geboren. Nach dem Besuch der Volksschule wechselte ich 1963 auf das Nicolaus-Kistner-Gymnasium in Mosbach über, wo ich am 9. Juni 1971 die Reifeprüfung ablegte.

Ich nahm im Wintersemester 1971/1972 mein Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen auf und bestand nach zwei Semestern die naturwissenschaftliche, nach fünf Semestern die ärztliche Vorprüfung.

Am 15. Januar 1977 heiratete ich in Tübingen Klaus Dieter Stock.

Auch während des klinischen Teils meiner Ausbildung studierte ich in Tübingen und beendete am 28. April 1978 das Studium mit dem dritten Teil der Ärztlichen Prüfung.